



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Caracterización del exón 4 del gen SLC22A2 (OCT2)
en poblaciones peruanas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Renzo Manuel CORTEZ PACHECO

ASESOR

Daniel Saúl ORÉ CHÁVEZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cortez, R. (2020). *Caracterización del exón 4 del gen SLC22A2 (OCT2) en poblaciones peruanas*. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América



Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

Dirección General de Biblioteca y Publicaciones Dirección del

Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

Hoja de metadatos complementarios

Nombre: RENZO MANUEL CORTEZ PACHECO

Código ORCID del autor (dato opcional): <https://orcid.org/0000-0001-7377-6297>

Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio):

Blga. Maria del Pilar Duyo Titto: <https://orcid.org/0000-0002-9342-3197>

Mg. Claudia Barletta Carrillo: <https://orcid.org/0000-0001-9982-5368>

Blgo. Alberto Lopez Sotomayor: <https://orcid.org/0000-0001-6070-5836>

Blgo. Daniel Saul Ore Chavez: <https://orcid.org/0000-0003-4510-4324>

DNI del autor: 73257195

Grupo de investigación: Genética Aplicada a la Biodiversidad (GAB)

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: Vicerrectorado de Investigación

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:

En Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad, Facultad de Ciencias Biológicas
(-12.059847, -77.082190)

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2017-2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

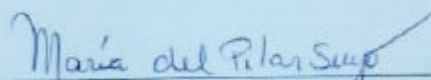
Siendo las 15:10 horas del 15 de enero de 2020, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **RENZO MANUEL CORTEZ PACHECO**.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 022-EPGB-2019, el titulado expuso su tesis: **"CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 4 DEL GEN *SLC22A2* (OCT2) EN POBLACIONES PERUANAS"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 17..., calificativo: ...Aprobado con mención honrosa...

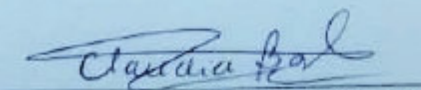
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **RENZO MANUEL CORTEZ PACHECO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

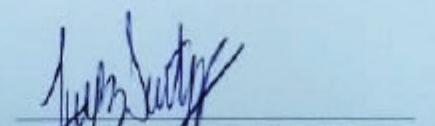
Siendo las 16:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de enero de 2020.


Blga. MARIA DEL PILAR SUYO TITTO
(PRESIDENTA)


Blgo. DANIEL ORE CHAVEZ
(ASESOR)


Mg. CLAUDIA BARLETTA CARRILLO
(MIEMBRO)


Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi familia, amigos y a las personas que contribuyeron con mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por el apoyo incondicional.

A mi asesor Daniel Oré, por apoyarme desde la realización del proyecto de tesis.

A la doctora Frida, por conseguir muestras de una comunidad amazónica para la presente tesis.

A la profesora Margarita Velázquez, por el modelo de Consentimiento Informado que me facilitó.

A la profesora Rina Ramírez por facilitarme el uso del Nanodrop Lite de su laboratorio para la cuantificación de muestras de ADN.

Al profesor Abad Flores por facilitarme el uso del Transluminador para la visualización de geles de agarosa.

Al profesor Pablo Ramírez por facilitarme el uso del fotodocumentador para la visualización de geles de agarosa.

A todas las personas que contribuyeron con muestras para la realización de mi tesis.

Este proyecto fue financiado parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

ABREVIATURAS

OCT1:	TRANSPORTADOR CATIONICO ORGÁNICO 1
OCT2:	TRANSPORTADOR CATIONICO ORGÁNICO 2
OCT3:	TRANSPORTADOR CATIONICO ORGÁNICO 3
PMAT:	TRANSPORTADOR DE MONOAMINAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA
THR-2:	TRANSPORTADOR DE TIAMINAS 2
<i>SLC22A2</i>:	TRANSPORTADOR DE SOLUTOS FAMILIA 22 MIEMBRO 2
AMPK:	PROTEINA KINASA ACTIVADA POR AMP
AMP:	ADENOSIN MONOFOSFATO
ADP:	ADENOSIN DIFOSFATO
ATP:	ADENOSIN TRIFOSFATO
MATE1:	EXTRUSIÓN DE MULTIDROGAS Y TOXINAS 1
MATE2:	EXTRUSIÓN DE MULTIDROGAS Y TOXINAS 2
PCR:	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERADA
OE-PCR:	PCR POR EXTENSIÓN EN SOBRELAPAMIENTO

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. ANTECEDENTES	2
2.2. BASE TEÓRICA.....	8
2.2.1. Diabetes Mellitus	8
2.2.1.1. Definición.....	8
2.2.1.2. Clasificación.....	8
2.2.1.3. Tratamiento	9
2.2.2. Metformina	10
2.2.2.1. Química	11
2.2.2.2. Farmacocinética	12
2.2.2.3. Farmacodinámica	14
2.2.3. Transportadores de membrana y su impacto sobre la disposición de los fármacos	16
2.2.4. Transportador catiónico orgánico 2	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Material biológico.....	19
4.2. Material de laboratorio.....	19
4.3. Colecta de muestras	20
4.4. Extracción y purificación de ADN genómico.....	21
4.5. Concentración y calidad del ADN obtenido	22
4.6. Diseño de cebadores	22
4.7. PCR convencional.....	24

4.8.	OE-PCR	26
4.9.	Secuenciamiento	29
4.10.	Detección de polimorfismos.....	30
5.	RESULTADOS	31
5.1.	Extracción de ADN.....	31
5.2.	PCR convencional.....	31
5.3.	OE-PCR	34
5.4.	Secuenciamiento de ADN.....	35
5.5.	Comparación de frecuencias alélicas entre muestra poblacional mestiza y nativa	40
6.	DISCUSIÓN.....	42
7.	CONCLUSIONES	46
8.	RECOMENDACIONES	47
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10.	ANEXOS	55
10.1.	Consentimiento Informado.....	55
10.2.	Acta de aprobación del Comité de Ética del Instituto de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos	59
10.3.	Diagrama farmacocinético de la metformina	60
10.4.	Mecanismo de acción de la metformina.....	61

RESUMEN

Actualmente la Diabetes Mellitus Tipo 2 es un problema de salud pública mundial, debido a factores como el estilo de vida de la población, con tendencia al sedentarismo y consumo de comidas procesadas, lo que contribuye a su actual incremento. El tratamiento de primera línea es la administración de metformina, un fármaco antihiper glucémico cuya farmacodinámica depende de transportadores como los OCTs, tanto para su ingreso a las células como para su excreción vía urinaria. La gran variabilidad interindividual de la concentración plasmática de metformina indica una variación en la tasa de excreción del fármaco, reportado por distintos autores en otras poblaciones, la cual es causada por variaciones en genes encargados de su excreción, como el gen *SLC22A2*, codificante del transportador catiónico OCT2. En el presente estudio se estandarizó una técnica para la unión de productos de PCR diferentes, haciendo uso de la técnica OE-PCR, con la cual se unieron los exones 2, 3 y 4 del gen *SLC22A2*.

Se caracterizó el exón 4 del gen *SLC22A2* en peruanos nativos y mestizos, detectándose en un 6.25% de individuos el polimorfismo 808C>A en heterocigosis (uno de la población nativa y dos de la mestiza), el 93.75% de individuos restantes presentaron el genotipo 808AA, estos resultados concuerdan con los que se encuentran en la base de datos 1000 Genomas.

Esta variante tiene una gran implicancia farmacológica y ha sido reportada en diversos estudios como causante de un menor aclaramiento del fármaco, conllevando a un aumento de su concentración plasmática, pudiendo ocasionar efectos adversos en pacientes.

Este estudio sirve como base para análisis más amplios de este y otros genes en la población peruana con implicancia farmacológica para enfermedades como la diabetes tipo 2.

Palabras clave: Diabetes Mellitus Tipo 2, *SLC22A2*, OCTs, variabilidad, metformina.

SUMMARY

Currently, Type 2 Diabetes Mellitus is a global public health problem, due to factors such as the lifestyle of the population, with a tendency to sedentary lifestyle and consumption of processed foods, which contributes to its current increase. The first-line treatment is the administration of metformin, an antihyperglycemic drug whose pharmacodynamics depends on transporters such as OCTs, both for its entry into the cells and for its excretion via the urinary tract. The large interindividual variability of plasma metformin concentration indicates a variation in the rate of excretion of the drug, reported by different authors in other populations, which is caused by variations in genes responsible for its excretion, such as the SLC22A2 gene, encoder of the transporter cationic OCT2. In the present study, a technique for the union of different PCR products was standardized, using the OE-PCR technique, with which exons 2, 3 and 4 of the SLC22A2 gene were joined.

Exon 4 of the SLC22A2 gene was characterized in native and mestizo Peruvians, detecting in a 6.25% of individuals the 808C> A polymorphism in heterozygosis (one of the native population and two of the mestizo), 93.75% of remaining individuals presented the genotype 808AA, these results are consistent with those found in the 1000 Genomes database.

This variant has a great pharmacological implication and has been reported in several studies as the cause of a lower clearance of the drug, leading to an increase in its plasma concentration, which may cause adverse effects in patients.

This study serves as the basis for broader analyzes of this and other genes in the Peruvian population with pharmacological implication for diseases such as type 2 diabetes.

Keywords: Type 2 Diabetes, *SLC22A2*, OCTs, variability, metformin

INDICE DE FIGURAS

- Figura N° 1.** Planta *Galega officinalis*
- Figura N° 2.** Estructura química de la metformina (1,1-Dimetilbiguanidina)
- Figura N° 3.** Transporte de la metformina hacia la vía sistémica a través de los enterocitos
- Figura N° 4.** Transporte de la metformina al interior de las células (hepatocitos)
- Figura N° 5.** Transporte de la metformina hacia la vía de excreción urinaria (MET: metformina)
- Figura N° 6.** Esquema representativo de la reacción de OE-PCR
- Figura N° 7.** Optimización de la PCR a 60 °C.
- Figura N° 8.** Resultados de la amplificación de 48 muestras del exón 4
- Figura N° 9.** Amplificación de muestras de ADN de diferentes poblaciones
- Figura N° 10.** Amplificación de muestras adicionales de ADN
- Figura N° 11.** Resultados de la reacción de OE-PCR de 4 muestras.
- Figura N° 12.** Alineamientos de las secuencias amplificadas del exón 4.
- Figura N° 13.** Alineamientos de las secuencias amplificadas por OE-PCR (Exones 2, 3 y 4 unidos).
- Figura N° 14.** Electroferograma del exón 4 secuenciado.
- Figura N° 15.** Frecuencias alelicas obtenidas en el presente estudio comparadas con las obtenidas adicionando la información de la base de datos 1000 genomas.
- Figura N° 16.** Frecuencias genotípicas obtenidas en el presente estudio comparadas con las obtenidas adicionando la información de la base de datos 1000 genomas.

Figura 17. Prueba de chi-cuadrado de las frecuencias alélicas de las poblaciones mestizas y nativa, se observa que el pvalue es igual a 1, por lo que no existe diferencia significativa entre ambas poblaciones.

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Cebadores empleados en el estudio para el análisis de los exones 2, 3 y 4 del gen *SLC22A2*. * Kang H, et al. (2007), **diseñados para la presente Tesis.

Tabla N° 2. Muestras enviadas a secuenciar.

Tabla N° 3. Frecuencias alélicas del polimorfismo *SLC22A2* c.808C>A de la muestra peruana analizada en el estudio y otras poblaciones.

1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus de tipo II es una enfermedad crónica caracterizada por una alteración metabólica que produce resistencia a la insulina, esto ocasiona un aumento de los niveles de glucosa (hiperglicemia) y, con el pasar del tiempo, trae complicaciones microvasculares y cardiovasculares severas. La incidencia de esta enfermedad se encuentra actualmente en incremento debido a la presencia de factores de riesgo en la población, como sedentarismo y consumo de comidas procesadas. A nivel mundial se calcula que para el 2030 la población afectada será de 336 millones (Wild et al, 2003).

La incidencia de la diabetes y pre-diabetes en la población peruana es del 7% y 23.5%, respectivamente, y es la causa número 15 de muerte en el país. Se calcula que alrededor de un millón de peruanos la padece y cerca de dos millones presentan los síntomas de una prediabetes sin saberlo hasta que ya desarrollen la enfermedad (Seclén *et al*, 2015). En resumen, cerca de tres millones de peruanos (aproximadamente 10% de la población), viven con trastornos del metabolismo en la glucosa. Esta enfermedad reduce significativamente la calidad de vida y se traduce en complicaciones agudas y crónicas que llevan a discapacidad y finalmente a mortalidad.

El tratamiento de primera línea para reducir los altos niveles de glucosa es la administración de metformina, un fármaco perteneciente a la familia de las biguanidas que actúa a nivel hepático, aumentando la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos e inhibiendo la gluconeogénesis. La metformina se elimina principalmente en la orina a través del transportador catiónico orgánico OCT2, codificado por el gen *SLC22A*. Diversos estudios han reportado la presencia de ciertos polimorfismos en este gen (Saito et al, 2002; Jacobs et al, 2015) demostrando mediante estudios farmacocinéticos que algunas de estas variantes alteran su función y disminuyen considerablemente el transporte y excreción del fármaco (Choi & Song, 2008; Fujita et al, 2006; Leabman et al, 2002; Tzvetkov et al, 2009; Song et al, 2008b; Shikata et al., 2006), lo que conduce a un aumento de su concentración plasmática que finalmente puede ocasionar efectos adversos, como acidosis láctica.

En este contexto, es de importancia realizar un estudio poblacional para analizar la diversidad de este gen, permitiéndonos identificar polimorfismos presentes en la población peruana, entre las cuales es posible detectar mutaciones aun no reportadas, las cuales podrían tener un efecto sobre la disposición de metformina. Además, la información generada puede ser empleada en el futuro, en experiencias de dosaje en plasma, lo cual permitirá correlacionar el genotipo del paciente con la tasa de excreción del fármaco permitiendo implementar un tratamiento personalizado lo que evitaría efectos adversos tales como la acidosis láctica, producida por las altas concentraciones de metformina en el plasma sanguíneo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

GEN *SLC22A2*

En la especie humana, el gen *SLC22A2* se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, tiene una extensión de 42067 pares de bases y se encuentra en la hebra negativa. Está compuesto por 11 exones, su transcrito y región codificantes (CDS) tienen una extensión 2409 nucleótidos 1668 nucleótidos, respectivamente.

Éste gen codifica una proteína transportadora de 555 aminoácidos (OCT2), la cual se encarga del transporte de diversos compuestos catiónicos, como por ejemplo hormonas y fármacos, para su eliminación por vía urinaria (Jonker & Schinkel, 2003).

Las variantes en la secuencia codificante de este gen puede alterar la conformación correcta del transportador y, por tanto, su función, disminuyendo así, la tasa de eliminación del fármaco y aumentando su concentración plasmática, lo cual podría alterar el tratamiento antidiabético y causar efectos adversos.

Se han reportado varias variantes del gen *SLC22A2*, algunas de las cuales disminuyen el aclaramiento del fármaco (Viollet & Foretz, 2013).

Además de este, genes transportadores catiónicos, expresados a nivel del intestinal, pueden estar relacionados a la variación en la biodisponibilidad del fármaco (Takane et al., 2008).

ESTUDIOS POBLACIONALES DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *SLC22A2*

Antecedentes en África

Sudáfrica

Jacobs C. *et al.* (2015) al analizar la población sudafricana de Xhosa, detectaron 27 polimorfismos en el gen *SLC22A2*, de los cuales 3 eran nuevos. De estas, 4 variantes se localizaban en la región 5' UTR, 8 en la región codificante y 15 en la región no codificante o intrónica. En la región codificante 4 variantes fueron no sinónimas (A270S, R400C, K432Q y I552N), tres de las cuales han sido previamente analizadas por Leabman et al (2002), el cual reportó que las variantes R400C y K432Q resultan en un cambio deletéreo en la función del transportador humano OCT2.

Antecedentes en Asia

Corea

Song *et al.* (2008a) estudiaron la influencia del transportador catiónico OCT2 en el transporte tubular renal de la metformina y de tres variantes no sinónimas encontradas en una población de Corea: T199I, T201M y A270S. Se utilizaron cultivos celulares procedentes de epitelio renal porcino LLC-PK, a los cuales se les insertó el alelo normal y las variantes mencionadas. Se evaluó la absorción de la metformina inyectando a cada cultivo celular 90 ng de metformina, incubándolos dos días para luego medir la eficacia de cada variante y compararlo con el alelo normal. Se determinó que hay una disminución de la actividad de transporte de metformina por tres variantes no sinónimas de OCT2: T199I, T201M y A270S, las cuales reducen la eliminación renal de metformina y pueden ser responsables de la gran variabilidad interindividual en la

farmacocinética de este fármaco, además, puede estar asociada también a la acidosis láctica la cual podría presentarse en pacientes con variantes OCT2 funcionalmente defectuosas.

En otro estudio, Song I., et al (2008b) analizan tres variantes del gen *SLC22A2*: 596C>T, 602C>T y 808G>T en una población de Corea y evalúa su efecto en la absorción de la metformina a nivel renal. El estudio se realiza tanto *in vitro*, en células HEK 293 que expresaban el transportador OCT2 y sus variantes, como *in vivo*, en 26 pacientes a los que se le administró 500 mg de metformina vía oral para posteriormente analizar la concentración del fármaco en sangre y orina. En el primer caso se observa una disminución de la absorción de metformina de las células, siendo esta menor al control. *In vivo* se observa un aumento de la concentración del fármaco a nivel del plasma. Se determina que tanto las variantes del gen *SLC22A2* como las de *SLC22A1* deben ser tomadas en cuenta para la administración de una dosis correcta.

Yoon H. *et al.* (2013) concluyen después de analizar el efecto de siete polimorfismos genéticos en los transportadores catiónicos orgánicos OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, MATE1 y MATE2-K en la farmacocinética de la metformina, que se debe tener en cuenta tanto las variantes genéticas de OCTN1-917C> T y OCT2-808 G>T para la administración de una dosis adecuada en pacientes que padecen diabetes.

China

Wang *et al.* (2008) caracterizaron las variaciones genéticas en la posición 808 del gen *SLC22A2* en una población china y analiza la capacidad funcional de estas variantes usando metformina como sustrato solo o en presencia de su inhibidor de transporte, la cimetidina. Se secuencian todos los exones del gen usando ADN genómico de 112 individuos sanos. Se evaluó la variante más común, 808G>T (Ala270Ser) y se estudió su efecto farmacocinético ante la administración de metformina solo y junto a cimetidina. Se demuestra por primera vez en la población china la existencia de polimorfismos genéticos en el transportador OCT2 además que el polimorfismo 808G>T conlleva a una disminución del aclaramiento tubular de la metformina.

Li *et al.* (2010) realizan un estudio en pacientes chinos con diabetes mellitus tipo 2 y analizan el efecto del polimorfismo 808G>T en la concentración plasmática de lactato luego de una administración de 500 mg metformina. Se encontraron tres genotipos del gen *SLC22A2* en la posición 808 (exón 4): GG, GT y TT en 400 pacientes diagnosticados de diabetes tipo 2. Se encontró que el nivel promedio de lactato en pacientes con el genotipo homocigoto mutante TT fue el más alto de todos los grupos; sin embargo, el nivel de HbA1c fue el más bajo. Se demostró que la variante del gen *SLC22A2* (808G>T) influye en el metabolismo de la metformina *in vivo*, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con los genotipos GG y TT, señalando la necesidad de ampliar el tamaño a fin de corroborar estos resultados en el futuro.

Hou W. *et al.* (2015) analizan la variante 808G>T en el transportador catiónico OCT2 en una población de 220 individuos chinos con diabetes de tipo 2 a los cuales se les pidió que tomaran metformina por al menos un año. Se tomaron muestras de sangre y se procedió a realizar la amplificación y secuenciación del exón 4 para observar las variantes en la posición 808. Se estudió a largo plazo la eficacia clínica de la metformina en pacientes con el alelo normal y con los mutantes, encontrando que estos últimos producen un efecto benéfico a largo plazo reduciendo con mayor eficacia los niveles de glucosa en sangre. Se demuestra por primera vez que la variante 808G>T al disminuir la excreción del fármaco también podría mejorar a largo plazo el efecto anti-diabético en pacientes chinos que sufren de diabetes mellitus tipo 2.

Japón

Fukushima-Uesaka H. *et al* (2004) estudió polimorfismos en los 11 exones del gen *SLC22A2* en una población de 116 individuos japoneses. Amplificaron primero los exones 1 al 9 y los exones 10 y 11 haciendo uso de una polimerasa de alta procesividad, capaz de amplificar por encima de los 17.5 kb, posteriormente se amplificó cada exón individualmente. Se secuenciaron los amplicones y se encontraron 33 variantes de este gen, de las cuales 14 eran nuevos reportes.

Ogasawara K. *et al.* (2008) estudiaron polimorfismos en la región promotora del gen codificante para el transportador catiónico OCT2 y también en los transportadores aniónicos OAT1-4 de la familia SLC22A que juegan un papel importante en la secreción renal de diversos fármacos. Se encontraron polimorfismos en los transportadores OCT2, OAT3 y OAT4 lo cuales fueron analizados para determinar el nivel de expresión de cada variante y del control transfiriendo las variantes a células LLV-PK1 haciendo ensayos con luciferasa. En el caso del transportador OCT2, la única variante que se identificó fue la delección -578_-576delAAG; la cual condujo a una reducción del 14% de la actividad del promotor. Este es el primer estudio para investigar la influencia de los polimorfismos en la expresión de mRNA en la familia *SLC22A* en el riñón.

Antecedentes en América

Estados Unidos

En el Instituto de Medicina Coriell (EE.UU.), se estudió la relación entre las variaciones de un gen que codifica un transportador renal de xenobióticos, OCT2 con relación a su función. Se analizaron los 11 exones del gen en 247 individuos identificándose 28 variantes de las cuales solo 9 son no sinónimas encontradas en sitios codificantes incluyendo una inserción que conlleva a una terminación prematura de la proteína. El análisis funcional realizado *in vitro* en ovocitos de *Xenopus laevis* indica que variantes como M165I y R400C reducen significativamente los valores de la velocidad máxima de transporte (V_{max}) en comparación a la muestra control siendo 50% y 70% menor con respecto al control. Estos datos *in vitro* son difíciles de extrapolar a la depuración renal *in vivo*; sin embargo, sugieren que es posible que haya una alteración en la eliminación renal de fármacos en personas que presenten estas variantes (Leabman M. *et al.*, 2002).

ESTUDIOS POBLACIONALES DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN **SLC22A1**

En América del Sur no existen antecedentes acerca de los polimorfismos del gen *SLC22A2*, únicamente se cuentan con referencias sobre polimorfismos en el gen *SLC22A1*.

Argentina

En una población argentina, Yang P. *et al.* (2014) reportaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos no sinónimos: R61C, P341L, M420del, G401S y G465R, del gen *SLC22A1* (codificante del transportador OCT1), en pacientes diabéticos. El análisis de asociación realizado mostró que los pacientes que portaban las mutaciones R61C y G401S tuvieron una tendencia a presentar niveles más altos de glucemia y hemoglobina glicosilada (HbA1c), sin embargo estos resultados no fueron significativos. Por otro lado, los pacientes con las mutaciones M420del y G465R, presentaron mayores niveles de HbA1c ($p < 0.05$). En cuanto al resto de parámetros, no se observaron diferencias significativas.

Perú

Olivares *et al.* (2017) estudiaron la distribución y frecuencia del polimorfismo 408Val/Met del gen *SLC22A1* (OCT1) en las poblaciones de Lima y Puno (Uros, Taquile y Amantaní), un transportador de membrana encontrado principalmente en el hígado y cuyas variantes pueden reducir el efecto terapéutico de la metformina en pacientes diabéticos, siendo la variante Met la asociada a una respuesta menos eficiente. Las frecuencias de los genotipos de la población total fueron: Val/Val=85,0% y Val/Met=15,0%. La frecuencia del alelo Val fue mayor en todas las poblaciones; mientras que el alelo Met, asociado con una menor respuesta a metformina, se encontró con frecuencias alélicas de 8.3%, 9.6% y 2.5% en las poblaciones de Amantaní, Lima y Uros, respectivamente, estando ausente en la población de Taquile.

2.2. BASE TEÓRICA

2.2.1. Diabetes Mellitus

2.2.1.1. Definición

Según la Organización Mundial de la Salud: “El término «*diabetes mellitus*» hace referencia a un desorden metabólico de múltiples etiologías caracterizado por una hiperglicemia crónica, con trastornos en el metabolismo de carbohidratos, las grasas y las proteínas, consecuencia de un defecto en la secreción de insulina, en su acción, o en ambas” (WHO, 1999).

Esta hiperglicemia a largo plazo trae consecuencias patológicas como neuropatía, retinopatía y posterior pérdida de la vista (Bourne R. et al., 2013), disfunción renal, incremento del riesgo de padecer ataques al corazón o derrame cerebral (Sarwar N. et al, 2010), entre otras, pudiendo conllevar a la muerte en última instancia.

2.2.1.2. Clasificación

La diabetes mellitus se divide en tres grupos etiológicos: Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2 y Diabetes Gestacional (WHO, 1999).

La diabetes tipo 1, o insulino-dependiente, es de tipo autoinmune y consiste en la destrucción progresiva de las células beta del páncreas por el mismo organismo, que las reconoce como antigénicas. A medida que avanza, la producción de insulina va decreciendo hasta llegar el punto de la aparición de síntomas a temprana edad generalmente. Las personas diagnosticadas con esta enfermedad dependerán de inyecciones periódicas de insulina de por vida, además de realizarse controles periódicos de glucosa en sangre, y de llevar un régimen alimentario especial. Existen personas a las cuales no se les detecta un desorden autoinmune,

en estas personas se denomina diabetes tipo 1 idiopática, ya no hay causa aparente.

La diabetes mellitus de tipo 2, o diabetes no insulino-dependiente, es el tipo de diabetes más frecuente y engloba al 90-95% del total de personas diabéticas. Esta es una enfermedad crónica que consiste en un déficit progresivo en la secreción de insulina tras un proceso de resistencia a la insulina (ADA: Asociación Americana de Diabetes), lo que causa un aumento de la glucosa a nivel sanguíneo por la incapacidad del organismo de asimilarla, en primera instancia, debido a la resistencia a la insulina (Lillioja S. et al., 1993) y finalmente por la incapacidad del organismo de producirla. La resistencia a la insulina es causada por varios factores, entre ellos una alimentación inadecuada y sedentarismo, esto causa que las células del hígado y músculo vayan dejando de expresar transportadores de glucosa (GLUT4) lo que impide el ingreso de la misma progresivamente, evidenciándose en un alto nivel de glucosa en sangre (hiperglicemia), la resistencia a la insulina es de carácter reversible.

La diabetes gestacional es la intolerancia al consumo de carbohidratos que resulta en una hiperglicemia cuya severidad varía y que es diagnosticada por primera vez durante los controles de embarazo (WHO, 1999).

2.2.1.3. Tratamiento

Dependiendo del tipo de diabetes presentada el tratamiento puede ser de tipo terapia insulínica, terapia con agentes anti-hiperglucémicos o mixta.

La terapia con insulina es administrada principalmente a los que padecen diabetes de tipo 1, ya que estos no producen o producen en cantidades mínimas esta hormona, por lo que es necesario que se la administre por vía muscular, además puede complementarse

con algún anti-hiperglicemiante oral, como metformina o sulfonilureas.

Para la diabetes tipo 2, en cambio, existe una resistencia a la insulina que impide el ingreso normal de glucosa al medio intracelular, en este caso la terapia de primera línea es la administración oral de metformina, en una dosis dependiente de los niveles de glucosa basal y hemoglobina glicosilada, en caso no ser suficiente se administra además algún otro agente anti-hiperglucémico o insulina.

2.2.2. Metformina

El tratamiento de primera línea para la diabetes de tipo 2 es la metformina, un fármaco perteneciente a la familia de las biguanidas presente en la planta *Galega officinalis* (Fig. 1), cuyos extractos se usaban durante la edad media para tratar la diabetes (Bailey C., 1989). Este fármaco se encuentra en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2019) y su principal acción es reducir los niveles de glucosa en sangre (antihiperglucémico) mediante el aumento de la captación celular de la misma.



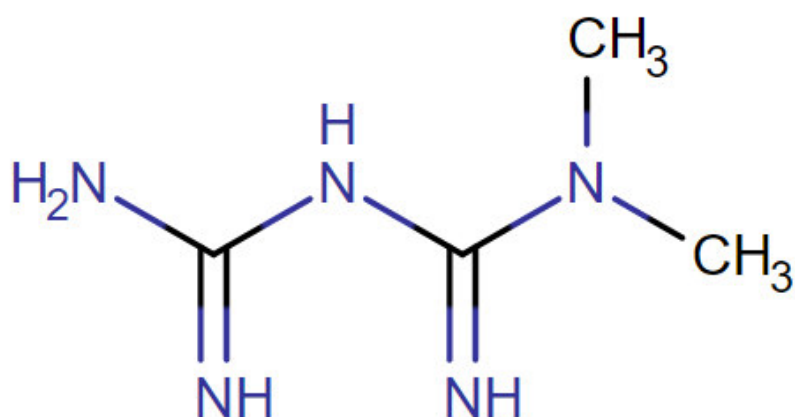
Fig. 1 Planta *Galega officinalis*. [Fuente: <https://www.123rf.com/>]

2.2.2.1. Química

El nombre químico de la metformina es 1,1-Dimetilbiguanidina, y pertenece a la clase de las biguanidas, moléculas compuestas por dos moléculas de guanidina (Fig. 2).

Este fármaco es comercializado como hidrocloreto de dimetilguanidina, y su síntesis fue descrita en 1922, empleando un método que consistía en una reacción de una sola etapa en la que se mezclaba hidrocloreto de dietilamina con 2-cianoguanidina, calentando a alta temperatura para favorecer la reacción (Werner E. & Bell J., 1922). Ya en 1975, surge una patente para la síntesis de ésta, utilizando cantidades equimolares de dimetilamina y 2-cianoguanidina, disolviéndolas en tolueno a baja temperatura para obtener una solución concentrada, luego se va agregando cloruro de hidrógeno lentamente; la mezcla genera una reacción exotérmica, por lo que se calienta, y luego de enfriarse el hidrocloreto de dimetilguanidina precipita en un 96% (Patente FR 2322860).

F



uctura química de la metformina (1,1-Dimetilbiguanidina) [Fuente:
<https://es.wikipedia.org/wiki/Metformina>]

2.2.2.2. Farmacocinética

Absorción

La metformina es administrada por vía oral, y es absorbida lentamente por los enterocitos a nivel del duodeno, a través de transportadores como el OCT 3 (Chen E., 2015), THR-2 (Liang X., et al., 2015) y, según estudios *in vitro*, puede que sea transportado también por medio del transportador de monoaminas PMAT, favorecido por el pH ácido del intestino (Zhou M., 2007), todos ubicados en el lumen del intestino delgado, para luego partir hacia la vía sistémica a través del transportador OCT1 (Muller J., 2005) ubicado en la membrana basolateral de los enterocitos (Fig. 3).

La metformina ingresa a los hepatocitos principalmente a través del transportador catiónico orgánico 1 (OCT1) (Wang D., et al., 2002) y probablemente en menor cuantía a través del OCT3, ambos transportadores están expresados en la membrana basolateral de los hepatocitos, siendo el OCT1 el que se encuentra en mayor concentración (Fig. 4).

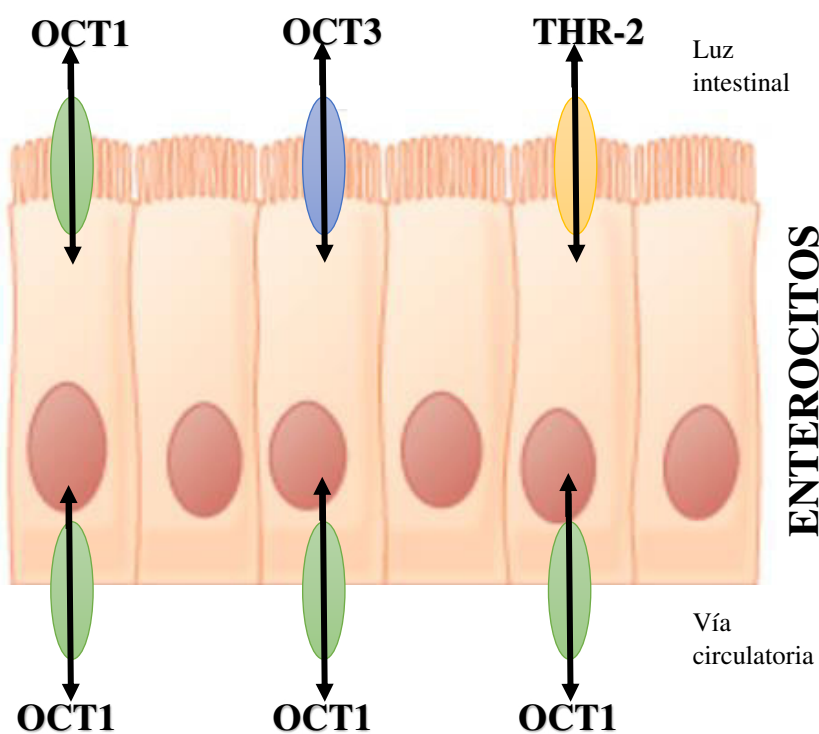


Fig. 3 Transporte de la metformina hacia la vía sistémica a través de los enterocitos [Elaboración propia]

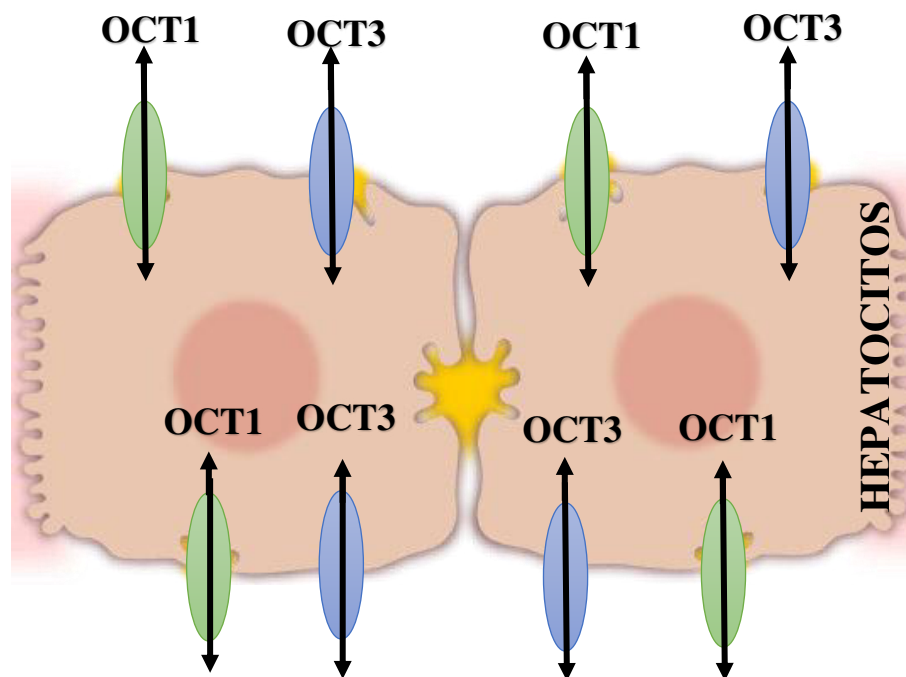


Fig. 4 Transporte de la metformina al interior de las células (hepatocitos)
[Elaboración propia]

Distribución

Una vez alcanzada la vía sistémica, la metformina viaja libre por la circulación, no se une a proteínas séricas como la albúmina, por lo que su distribución a los diferentes tejidos es rápida. La metformina tiene una vida media de alrededor de 5 horas (Graham G. *et al.*, 2011) en el organismo de una persona sin problemas renales.

Metabolismo

La metformina no sufre efecto de primer paso, ni biotransformación hepática, por lo que es excretada en su forma original principalmente por vía renal.

Excreción

La principal vía de excreción de la metformina es a través de la orina, y ya que no sufre procesos de biotransformación, ésta es eliminada en forma íntegra. El transporte del fármaco de la sangre

a la vía urinaria se realiza en primera instancia a través del transportador OCT2 (Dresser M. *et al.*, 2002), ubicado en la membrana basolateral del túbulo proximal del riñón (Jonker & Schinkel, 2003), permitiendo su ingreso al medio intracelular, para luego ser transportada hacia la orina por medio de los transportadores MATE1 y MATE2 (Ito S. *et al.*, 2011), completando el proceso farmacocinético del fármaco (Fig. 5).

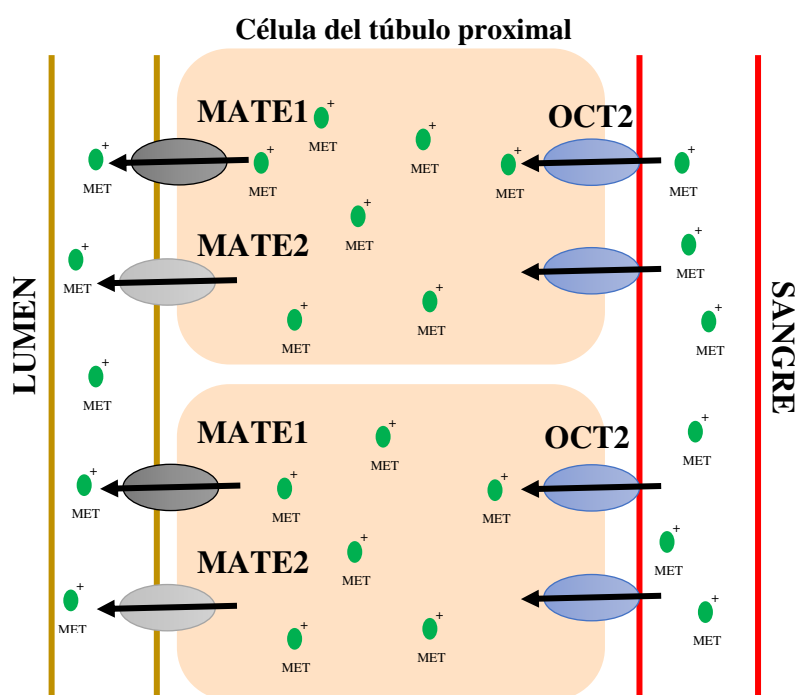


Fig. 5 Transporte de la metformina hacia la vía de excreción urinaria (MET: metformina) [Elaboración propia]

2.2.2.3. Farmacodinámica

El mecanismo de acción de la metformina aún no está completamente dilucidado, sin embargo se conoce que ésta actúa sobre las células hepáticas ingresando al medio intracelular a través de transportadores catiónicos orgánicos (OCTs), a nivel hepático se expresa principalmente el transportador OCT1, a través del cual la metformina ingresa para ejercer su acción hipoglucemiante.

El mecanismo de acción de la metformina empieza a nivel de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, con la que interacciona de forma inhibitoria (El-Mir *et al.*, 2000) lo que causa un estrés energético y un aumento de ADP y AMP intracelular, aumentando el ratio AMP:ATP y ADP:ATP que luego producirá un cambio conformacional de la proteína AMPK por la unión de ADP/AMP a la subunidad gamma, lo que induce su fosforilación en el residuo Thr-172 (Hawley *et al.*, 1995; Oakhill *et al.*, 2011) e inhibe además su defosforilación (Suter *et al.*, 2006). La activación de esta molécula es un paso clave en el proceso ya que ésta actuará sobre el metabolismo por medio de la activación y transcripción de ciertas proteínas, con el objetivo de restablecer el balance energético de la célula. Algunos de sus efectos son:

- Inhibición de la gluconeogénesis
- Aumento de la captación de glucosa
- Oxidación de ácidos grasos
- Disminución en la síntesis de colesterol
- Disminución en la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos
- Disminución en la expresión de genes lipogénicos y gluconeogénicos

De todos los efectos resaltan el aumento de la captación de glucosa, por medio de la expresión de transportadores GLUT 1 y 4, mediante la activación de GLUT1 (Barnes *et al.*, 2002) y mediante la inhibición por defosforilación de TBC1D1, proteína inhibidora de la fusión de GLUT4 a la membrana, permitiendo el ingreso de glucosa al medio intracelular, reduciendo sus niveles en sangre (Frøsig *et al.*, 2010).

2.2.3. Transportadores de membrana y su impacto sobre la disposición de los fármacos

Los transportadores de membrana son moléculas de naturaleza proteica que se caracterizan por permitir el paso selectivo de ciertas moléculas del medio extracelular al intracelular, o viceversa. Estas cumplen un rol fundamental en la farmacodinámica y farmacocinética de los fármacos. Existen tres tipos de transportadores de membrana: los transportadores de tipo uniporte (por ejemplo: OCT1, OCT2), que transportan una sola molécula; los de tipo simporte, que transportan dos moléculas a la vez en un solo sentido (por ejemplo: SGLT1); y los de tipo antiporte, que transportan dos moléculas, una hacia el medio intracelular y otra hacia el medio extracelular (por ejemplo: Bomba Na^+/K^+) (Amidon G., Sadeé W., 2004).

2.2.4. Transportador catiónico orgánico 2

El transportador catiónico orgánico OCT2 pertenece a la familia SLC22A de transportadores humanos y es codificado por el gen *SLC22A2*. Está compuesto de 12 dominios transmembrana de los cuales el primero y segundo forman un gran loop extracelular. Este posee la capacidad de hacer splicing alternativo, generando varias isoformas del mismo transportador.

El OCT 2 se expresa principalmente en las células renales (Gorboulev *et al.*, 1997) y contribuye significativamente a la disposición farmacocinética de varios fármacos, entre ellos la merformina. La metformina es el fármaco de primera línea para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, el cual es eliminado principalmente por medio del transportador OCT2, localizado en la membrana basolateral del túbulo proximal del riñón (Jonker & Schinkel, 2003).

2.2.5. PCR por extensión de solapamiento (“Overlap Extension PCR”)

Esta técnica se ha utilizado ampliamente para insertar mutaciones específicas (Higuchi R. et al., 1988) y crear plásmidos recombinantes (Bryksin A. & Matsumura I., 2010). Esta técnica permite también, poder unir fragmentos de ADN amplificados en reacciones individuales, con la finalidad de poder secuenciar todo en una sola reacción, lo cual es económicamente ventajoso. El fundamento de esta técnica subyace en el diseño de cebadores específicos que tengan una región complementaria al primer segmento de interés en el ADN molde y una región complementaria a la hebra opuesta en el siguiente segmento de interés, en caso de ser dos segmentos (de ser tres segmentos los cebadores diseñados se encontrarán en el segmento de interés intermedio, con la región complementaria a la hebra opuesta del final del primer segmento de interés y el inicio del tercero), cada amplicón se generará en una reacción de PCR individual, de tal forma que se generen amplicones con la región complementaria al otro segmento de interés, los cuales se juntarán en cantidades equimolares en una reacción adicional, en la cual las hebras del primer amplicón se unirán por complementariedad a la del segundo de dos formas diferentes: la primera en la cual los extremos 3' se encuentran en la región complementaria, y la segunda en la cual los extremos 5' se encuentran en la región de complementariedad (fig. 6). En el primer caso, la polimerasa sintetizará la cadena complementaria dado que los extremos 3' se encuentran presentes, en el segundo caso, la polimerasa no puede sintetizar la cadena complementaria dado que los extremos son 5', por lo que la cadena complementaria se sintetizará a partir de los cebadores sentido del segmento 1 y antisentido del segmento 2, completando la doble cadena del amplicón unido de ambos segmentos.

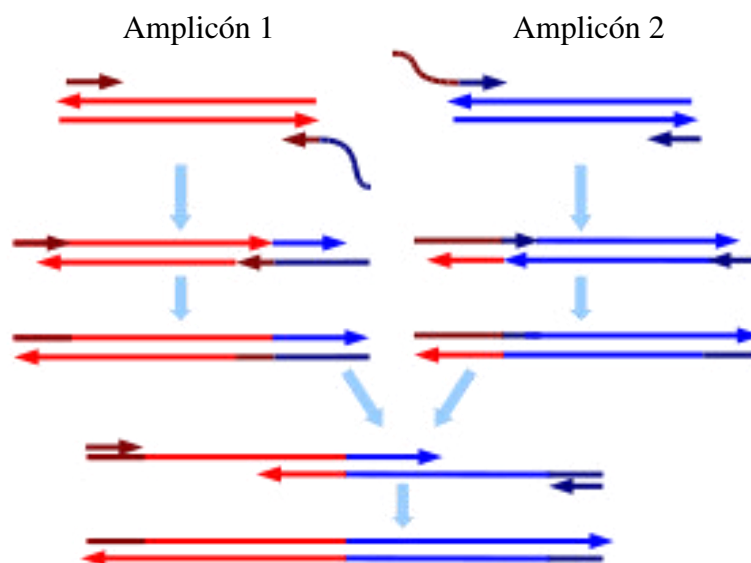


Figura 6. Esquema representativo de la reacción de OE-PCR para 2 productos de PCR individuales (cada uno de un color, rojo y azul). La obtención de los amplicones individuales se realiza en reacciones de PCR independientes, en las cuales se utilizan cebadores especiales para la región que será complementaria, ambos amplicones formados al final de la reacción contendrán una secuencia complementaria al otro amplicón, lo cual permitirá que se hibriden en la reacción subsiguiente de OE-PCR y se sintetice la cadena complementaria faltante a cada híbrido, para así obtener finalmente un amplicón con 2 secuencias unificadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Caracterizar los polimorfismos de secuencia nucleotídica del exón 4 del gen *SLC22A2* en 5 poblaciones mestizas y una nativa del Perú.

3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar los protocolos de PCR y OE-PCR para la obtención de secuencias nucleotídicas del gen *SLC22A2*.
- Comparar si existen diferencias genéticas entre los polimorfismos detectados entre poblaciones nativas y mestizas.
- Comparar con los datos reportados previamente en otras poblaciones humanas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

La población de estudio estuvo conformada por 150 personas naturales de 7 localidades del Perú: Norte: Paita (n=25), Cajamarca (n=25) y Chimbote (n=20); Centro: Lima (n=25); Sur: Chíncha (n=20) y Arequipa (n=20); y además de 15 pobladores de una comunidad nativa en Loreto (Tempestad) escogidas aleatoriamente, a las cuales explicaba en qué consistía el estudio para luego pedirles que firmen el consentimiento informado. A las personas que accedieron a firmar el consentimiento informado se les tomó una muestra de hisopado bucal con un hisopo (Alfymedix) por un minuto, posteriormente la muestra se guardaba en tubos con buffer TNE-Urea (Tris, NaCl, EDTA, Urea).

4.2. Material de laboratorio

Reactivos:

- Tris
- EDTA
- Ácido Bórico
- NaCl
- Sodio Dodecil Sulfato (SDS)
- Proteinasa K
- Urea
- Acetato de Amonio
- Etanol Absoluto
- Isopropanol
- Agua destilada
- Buffer de carga
- Taq Polimerasa
- MgCl
- Buffer para PCR 10X
- Cebadores
- Agua para PCR

Material de vidrio y plástico:

- Probeta
- Matraz
- Frascos Herber
- Cajas de tips de 1000, 200 y 10 μ l.
- Tips de 1000, 200 y 10 μ l
- Micropipetas de 1000, 200, 10 y 2 μ l
- Tubos de microcentrifuga de 2 ml
- Tubos de PCR de 200 μ l
- Racks

Equipos de laboratorio:

- Incubadora
- Cámara electroforética
- Fuente de poder de 300V
- Cámara fotográfica
- Termociclador
- Fuente de luz UV
- Microcentrífuga
- Nanodrop
- Ordenador de escritorio

4.3. Colecta de muestras

Los individuos se seleccionaron de forma aleatoria en las 7 localidades seleccionadas, se les explicó acerca del estudio y en qué consistía la toma de muestra, luego se les pidió que firmen un consentimiento informado asintiendo que están de acuerdo en formar parte de la investigación. A los que aceptaron se les tomó una muestra de saliva mediante la técnica de hisopado bucal, para esto se extrajo el hisopo estéril del empaque y se procedió a frotarlo por las mejillas internas del individuo al mismo tiempo que se rotaba para obtener una mayor cantidad de muestra. Al finalizar, el hisopo se colocó en su respectivo empaque para luego cortarse la parte con muestra y colocarse en un tubo de 2 ml estéril

con 500 µl de TNE-Urea hasta llegar al laboratorio, en donde se almacenó a 4°C hasta su uso.

Los lugares de colecta fueron los siguientes:

- Lima (Universidad Nacional Mayor de San Marcos)
- Ica (Plaza de Armas de Chincha).
- Arequipa (Plaza de Armas de Arequipa).
- Piura (Plaza de Armas de Paita y Malecón Paita).
- Cajamarca (Plaza de Armas de Cajamarca, Plazuela Amalia Puga).
- Ancash (Malecón Grau de Chimbote y Frente al Hospital La Caleta de Chimbote)
- Loreto (Comunidad Nativa de Tempestad, Maynas).

4.4. Extracción y purificación de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se usó un protocolo convencional mediante la técnica de Salting-Out (Aidar M. & Line S., 2007).

La muestra obtenida se encontraba en 500 µl de buffer TNE-Urea por aproximadamente un mes hasta su procesamiento. Primero se procedió a hacer la lisis, para esto se agregó al tubo 150 µl de SDS al 10% y 5 µl de Proteinasa K. Luego se homogenizó e incubó a 60 °C por una hora y media. A continuación se transfirió el lisado a un tubo nuevo de 2 ml estéril y se agregó 170 µl de solución de acetato de amonio 10 M, 20 µl de NaCl 5M y 800 µl de isopropanol frío, el hisopo que quedó en el tubo anterior se descartó en una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Se homogenizó e incubó a -20°C por 30 minutos. Pasado el tiempo la muestra se centrifugó a 13 500 RPM por 15 minutos luego del cual se eliminó el sobrenadante en una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Se agregó 100 µl de TE 20:5 y se resuspendió el pellet, luego se agregó 5 µl de NaCl 5M y 300 µl de etanol absoluto y se homogenizó. Se procedió a centrifugar nuevamente a 13 500 RPM por 15 minutos, decantando luego el sobrenadante en hipoclorito de sodio. A continuación se procedió a realizar los lavados, el primer lavado fue con 500 µl de etanol-TE 20:5 en una proporción del 70% y 30% respectivamente. Se

resuspendió el pellet y se procedió a centrifugar a 13 500 RPM por 15 minutos, decantando en solución de hipoclorito de sodio al finalizar. El segundo lavado fue con 500 µl de etanol-TE 20:1 en una proporción del 70% y 30% respectivamente. Se resuspendió el pellet y se procedió a centrifugar a 13 500 RPM por 15 minutos, decantando en solución de hipoclorito de sodio al finalizar. El último lavado fue con 500 µl de etanol-agua destilada en una proporción del 70% y 30% respectivamente. Se resuspendió el pellet y se procedió a centrifugar a 13 500 RPM por 15 minutos, decantando en solución de hipoclorito de sodio al finalizar. Finalmente la muestra se dejó secar en la incubadora hasta que se evapore todo el etanol para luego resuspender en 150 µl de solución TE 20:1 y almacenar a 4°C hasta su uso.

4.5. Concentración y calidad del ADN obtenido

Para evaluar la integridad del ADN se corrió 5 µl de ADN con 1.5 µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizó en un transluminador de luz UV.

Para determinar la cantidad y pureza del ADN se cuantificó 1µl de cada muestra de ADN en Nanodrop.

4.6. Diseño de cebadores

Para las reacciones de PCR individuales se usaron los cebadores previamente descritos por Kang H. et al (2007) para los exones 2, 3 y 4 del gen *SLC22A2* ya que estos son los que han presentado más variaciones de acuerdo a los estudios realizados (Fukushima-Uesaka et al., 2004; Song et al., 2008; Kang et al., 2007; Jacobs et al., 2015; Tzvetkov et al., 2009; Shikata E. et al., 2006).

Además se diseñó un par de cebadores especiales para el exón 3 (denominado ahora exón 3S**) para la reacción posterior de OE-PCR. Para esto se bajaron las secuencias de los amplicones correspondientes a los cebadores descritos por Kang et al. (2007), una vez obtenidas las secuencias, se utilizaron los cebadores para el exón 3 como base, adicionando a cada uno 30 pares de bases, las cuales eran complementarias a la región amplificada del exón 2 y 4, de tal modo que cada cebador contiene, adicionalmente a la región complementaria para el exón

3, dos secuencias adicionales complementarias para la región final e inicial, en el caso del cebador sentido y antisentido respectivamente, para la hebra complementaria de los amplicones 2 y 4, los cuales se muestran en la Tabla 1 y esquemáticamente en la Figura 6, de tal manera que al amplificar el exón 3 de las muestras se genere una región complementaria a los extremos del mismo que se complemente al exón 2 y 4 durante la fase de hibridación para la amplificación de la región exónica completa (exones 2, 3 y 4) en la siguiente reacción mediante la técnica OE-PCR (OE-PCR: *Overlap Extension PCR*).

Las regiones amplificadas de cada exón, los cebadores usados y diseñados se muestran en la figura 7.

Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Amplicón (pb)
2*	TTATGTCCAACAGGATTCTAACAGG	TCCAAGTGTTCTCCAAACCTT	239
3*	TCCATGCATTTTCCACAATC	TCTATTTTGGCAGCGAGGTT	282
4*	AGCTTCTGAACGCACGGC	CGAGAGGACAGAAAGCGCAG	315
3S**	ACAATAATGAGTTGGCTGTCCAGCT ATCAGTCTATTTTGGCAGCGAGGTT	CAATCCCAAAGGTTTGAAGAA CAC TTGGATTCCATGCATTTTCCAC AATC	282

Tabla 1. Cebadores empleados para el análisis de los exones 2, 3 y 4 del gen *SLC22A2*. * Kang H, *et al.* (2007), **diseñados para la presente Tesis.

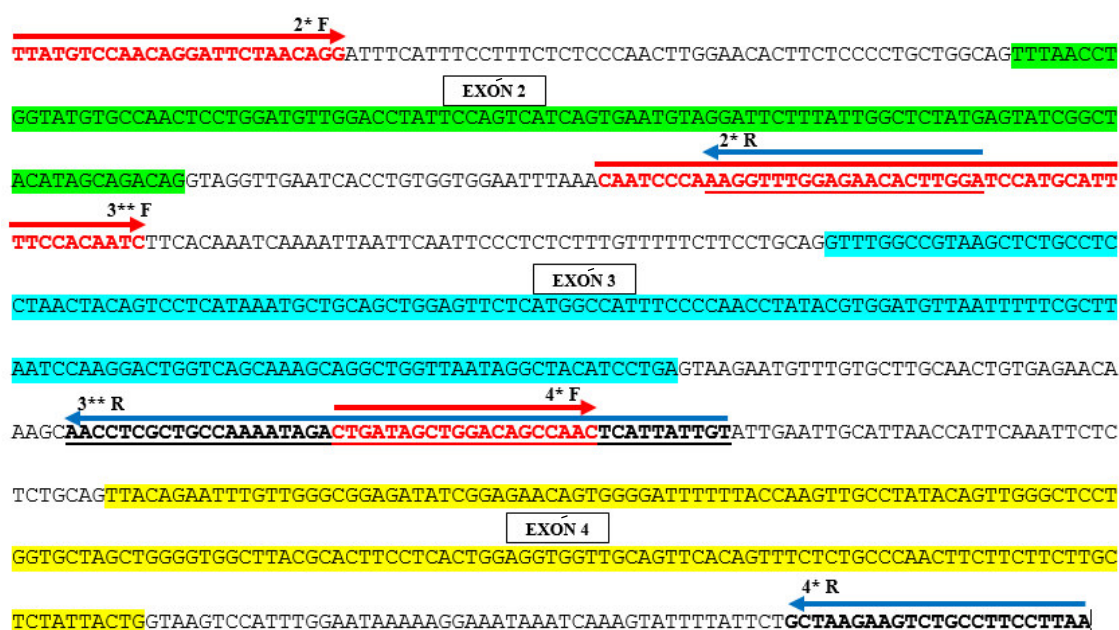


Figura 7. Regiones amplificadas por los diferentes cebadores usados para el estudio. Se muestran las regiones amplificadas y se resaltan los exones.

4.7. PCR convencional

Se realizó la reacción de PCR a partir del ADN genómico obtenido de las muestras recolectadas. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µL con las siguientes cantidades: Taq ADN polimerasa (5U/µL, ThermoScientific LTDA) (0.15 µL), Buffer para PCR NH₄SO₂ 10X (2.5 µL), MgCl₂ 25mM (1.5, 2.0 o 2.5 µL), dNTPs 10mM (0.2 µL), cebadores 10 mM (0.5 µL), ADN genómico 50-100 ng/µl (1-2 µL) y agua para PCR hasta un volumen final de 25 µL.

Las reacciones de PCR fueron optimizadas para las concentraciones de MgCl₂ (2.0 y 2.5 mM) como se detalla a continuación:

- Con MgCl_2 a 2.0 mM

Reactivos	X1	X6
Agua para PCR	18.75	112.5
Buffer para PCR 10X	2.5	15
MgCl_2 25 mM	2.0	12
dNTPs 10 mM	0.2	1.2
Cebador Sentido 10 μM	0.2	1.2
Cebador Antisentido 10 μM	0.2	1.2
Taq polimerasa (5U/ μL)	0.15	0.9
ADN	1	-

- Con MgCl_2 a 2.5 mM

Reactivos	X1	X6
Agua para PCR	18.25	109.5
Buffer para PCR 10X	2.5	15
MgCl_2 25 mM	2.5	15
dNTPs 10 mM	0.2	1.2
Cebador Sentido 10 μM	0.2	1.2
Cebador Antisentido 10 μM	0.2	1.2
Taq polimerasa (5U/ μL)	0.15	0.9
ADN	1	-

El termociclador fue programado como sigue:

95°	--	5 min	} x35 ciclos
95°	--	30 seg	
58°	--	30 seg	
72°	--	30 seg	
72°	--	10 min	
4°	--	∞	

Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% (teñido con Gel Red) por 20 minutos a 100 voltios, se utilizó 5 μL de amplicón con 2 μL de buffer de carga. Finalmente el gel se reveló en un fotodocumentador de luz UV.

Finalmente se escogió el siguiente protocolo para la amplificación de las muestras:

Master Mix 2	x1
Agua para PCR	18.25
Buffer para PCR 10X	2.5
MgCl ₂ 25 mM	2.5
dNTPs 10 mM	0.2
Cebador Sentido 10 μ M	0.2
Cebador Antisentido 10 μ M	0.2
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0.15
ADN	2

Luego de la optimización, se procedió a amplificar el exón 2, 3 y 4 de 40 muestras (8 individuos por población), y los exones 2, 3 y 4 de 8 individuos de la población nativa de Tempestad (Loreto) para completar media placa de secuenciamiento, haciendo uso del protocolo antes mencionado.

Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% (w/v) por 20 minutos, el cual se tiñó luego con bromuro de etidio por 20 minutos y finalmente reveló en un fotodocumentador. Los amplicones fueron almacenados a -20°C hasta su envío al extranjero para la reacción de secuenciamiento.

4.8. OE-PCR

Para la reacción del *overlap extension PCR* (OE-PCR) se tomó como referencia un protocolo descrito por Thornton J. (2014), el cual fue modificado según las condiciones del laboratorio. Para lo cual se utilizaron los amplicones obtenidos en la reacción de optimización a 58 °C, en dos ensayos separados:

1er ensayo

Se realizó la reacción de PCR haciendo uso de los amplificados del exón 2, exón 3S y exón 4, de los ensayos a 58 °C a 2.0 y 2.5 mM, usando los cebadores sentido del exón 2 y antisentido del exón 4 para amplificar la región completa, el protocolo fue el siguiente:

Reactivos	X1	X10
dNTPs	0.4	4
Cebador sentido (Exón 2) 10 µM	0.2	2
Cebador antisentido (Exón 4) 10 µM	0.2	2
Taq polimerasa (5U/µL)	0.2	2
Amplicones	30 (10 µL de cada exón)	-

Se programó el termociclador como sigue:

95°	--	5 min	} x35 ciclos
95°	--	1 min	
58°	--	1 min	
72°	--	1 min	
72°	--	10 min	
4°	--	∞	

2do ensayo

Se procedió a amplificar nuevamente los exones 2, 3S y 4 de las muestras anteriores ya que la reacción anterior había consumido lo que quedaba de cada reacción individual. El protocolo fue el mismo a 2.5 mM de MgCl₂ con cada exón individualmente. Se procedió a cuantificar los amplicones para diluirlos luego a 50 ng/µL y agregar a la reacción de PCR de unión cantidades equimolares de cada exón (100 ng).

Con estos resultados se procedió a realizar 3 subensayos: unión de exones 2-3-4, 2-3 y 3-4 de las muestras antes mencionadas con los siguientes protocolos:

- Exones 2-3-4

Reactivos	X1	X6
Agua para PCR	13.25	79.5
Buffer para PCR 10X	2.5	15
MgCl₂ 25 mM	2.5	15
dNTPs 10 mM	0.2	1.2
Cebador sentido 10 µM	0.2	1.2
Cebador antisentido 10 µM	0.2	1.2
Taq polimerasa (5U/µL)	0.15	0.9
ADN	6 (2 µL de cada exón)	-

- Exones 2-3

Reactivos	X1	X6
Agua para PCR	15.25	91.5
Buffer para PCR 10X	2.5	15
MgCl₂ 25 mM	2.5	15
dNTPs 10 mM	0.2	1.2
Cebador sentido 10 µM	0.2	1.2
Cebador antisentido 10 µM	0.2	1.2
Taq polimerasa (5U/µL)	0.15	0.9
ADN	4 (2 µL de cada exón)	-

- Exones 3-4

Reactivos	X1	X6
Agua para PCR	15.25	91.5
Buffer para PCR 10X	2.5	15
MgCl₂ 25 mM	2.5	15
dNTPs 10 mM	0.2	1.2
Cebador sentido 10 µM	0.2	1.2
Cebador antisentido 10 µM	0.2	1.2
Taq polimerasa (5U/µL)	0.15	0.9
ADN	4 (2 µL de cada exón)	-

Para la reacción de unión se utilizó el siguiente programa:

95°	--	5 min	
95°	--	30 seg	} x35 ciclos
58°	--	30 seg	
72°	--	45 seg	
72°	--	10 min	
4°	--	∞	

Los amplicones se corrieron luego en un gel de agarosa al 2.0% por 35 minutos a 100 voltios, se utilizó 5 µL de amplicón con 2 µL de buffer de carga, se cargó una columna con ladder de 100 pb para determinar si el peso molecular de las bandas obtenidas correspondía al teórico. Finalmente el gel se tiñó con bromuro de etidio por 20 minutos y se reveló en un fotodocumentador de luz UV.

4.9. Secuenciamiento

Los 48 amplicones de las muestras correspondientes a cada población se enviaron a secuenciar a la empresa McLab para obtener las secuencias correspondientes al exón 4 (Tabla 2). Las muestras de Chimbote no amplificaron debido a la baja concentración de ADN obtenida por lo que no se enviaron.

PCR exón 4 (48 muestras)			
CODIGO STRIP	#	Muestra	Población
A	1	CHI2	Chincha
	2	CHI3	
	3	CHI7	
	4	CHI9	
	5	CHI13	
	6	CHI15	
	7	CHI16	
	8	CHI20	
B	9	TEM1	Tempestad
	10	TEM3	
	11	TEM4	
	12	TEM5	
	13	TEM6	
	14	TEM9	
	15	TEM11	
	16	TEM14	
C	17	CAJ7	Cajamarca
	18	CAJ8	
	19	CAJ9	
	20	CAJ11	
	21	CAJ12	
	22	CAJ13	
	23	CAJ16	
	24	CAJ19	

D	25	PAI2	Paita
	26	PAI3	
	27	PAI12	
	28	PAI15	
	29	PAI16	
	30	PAI17	
	31	PAI20	
	32	PAI28	
E	33	ARE6	Arequipa
	34	ARE7	
	35	ARE8	
	36	ARE13	
	37	ARE14	
	38	ARE19	
	39	ARE23	
	40	ARE25	
F	41	LIM1	Lima
	42	LIM2	
	43	LIM4	
	44	LIM7	
	45	LIM10	
	46	LIM12	
	47	LIM13	
	48	LIM16	

Tabla 2. Muestras enviadas a secuenciar.

4.10. Detección de polimorfismos

Las secuencias amplificadas se observaron en electroferogramas en el programa Bioedit en donde se alinearon con la secuencia de referencia descargada de cada exón para determinar la presencia de mutaciones en las regiones codificantes (NC_000006 complemento 160216755...160258821, fecha de consulta Mayo 2018). Las mutaciones fueron curadas manualmente usando el mismo programa.

Se analizaron los polimorfismos de secuencia nucleotídica existentes y se determinó si eran sinónimos o no sinónimos dependiendo si alteran o no la secuencia aminoacídica de la proteína transportadora, se determinaron las frecuencias de éstas en la población de estudio y luego se compararon con los reportados previamente en otras poblaciones (Hou W. et al, 2015; Yoon et al,

2013; Song et al, 2008; Leabman et al, 2002; Fukushima-Uesaka et al, 2004), para inferir si disminuyen la absorción de metformina.

5. RESULTADOS

5.1. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de un total de 150 individuos de 7 muestras poblacionales peruanas.

Del total de muestras de ADN obtenidas, en el 100% se puede observar ADN íntegro, correspondiéndose a la banda intensa de mayor peso molecular. Las concentraciones obtenidas se encontraron en un rango de 5.0 a 177.6 ng/μL, mientras que la calidad (Abs 260/280) se encontró entre 1.11 a 2.00.

Los resultados de las corridas electroforéticas de las muestras de ADN extraídas y los resultados de cuantificación por Nanodrop se muestran en la sección ANEXOS.

5.2. PCR convencional

Los resultados de la optimización de la reacción de PCR para el exón 4 se pueden observar en la figura 8, se puede apreciar que la amplificación a la concentración más adecuada de MgCl₂ es 2.5 mM, sin embargo los resultados de esta son muy similares a los de MgCl₂ a 2.0 mM.

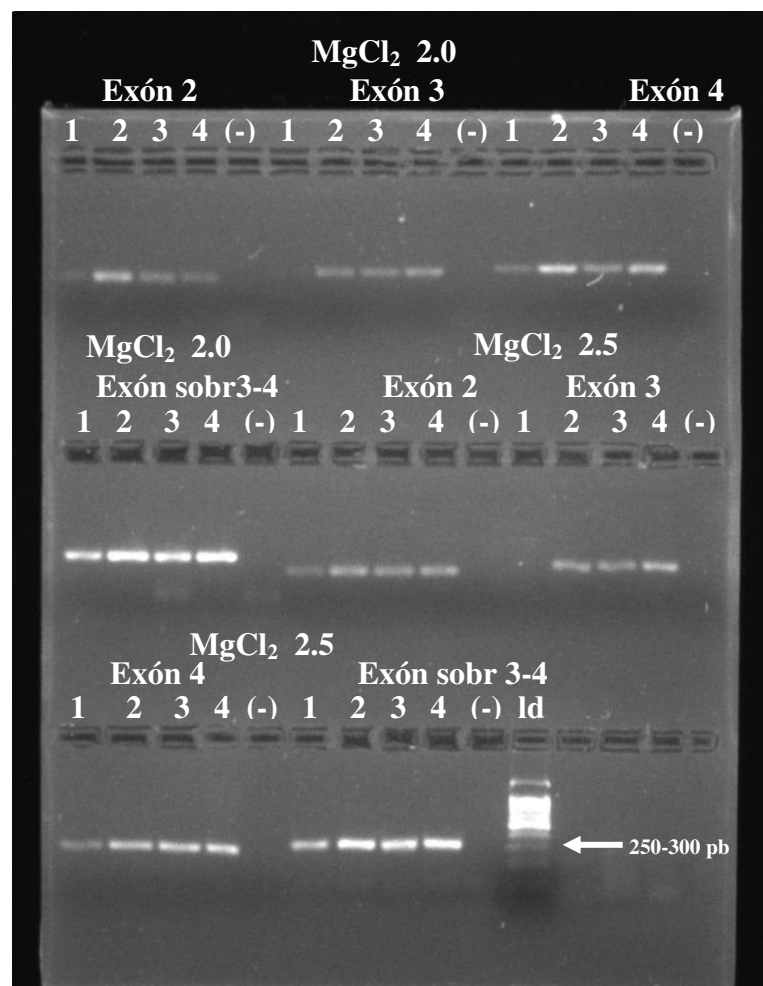


Figura 8. Optimización de la PCR a 58 °C de los exones 2, 3 y 4. Muestras de ADN para la optimización de la PCR corridas en un gel de agarosa al 2.5%, las muestras amplificadas se muestran a continuación: (1)CHI2. (2)PAI3. (3) TEM5. (4)CAJ4. (-)Control Negativo. (ld)Ladder 100 pb.

En la figura 9 se observa la amplificación de 48 muestras, se puede evidenciar que las 8 muestras de la población de Chimbote no amplificaron (41-48), además de 4 muestras adicionales de otras poblaciones, ante esto se realizó otra PCR con muestras adicionales para reemplazar las que no amplificaron y la población de Chimbote se reemplazó por Lima, ya que esta tenía mejores concentraciones de ADN.

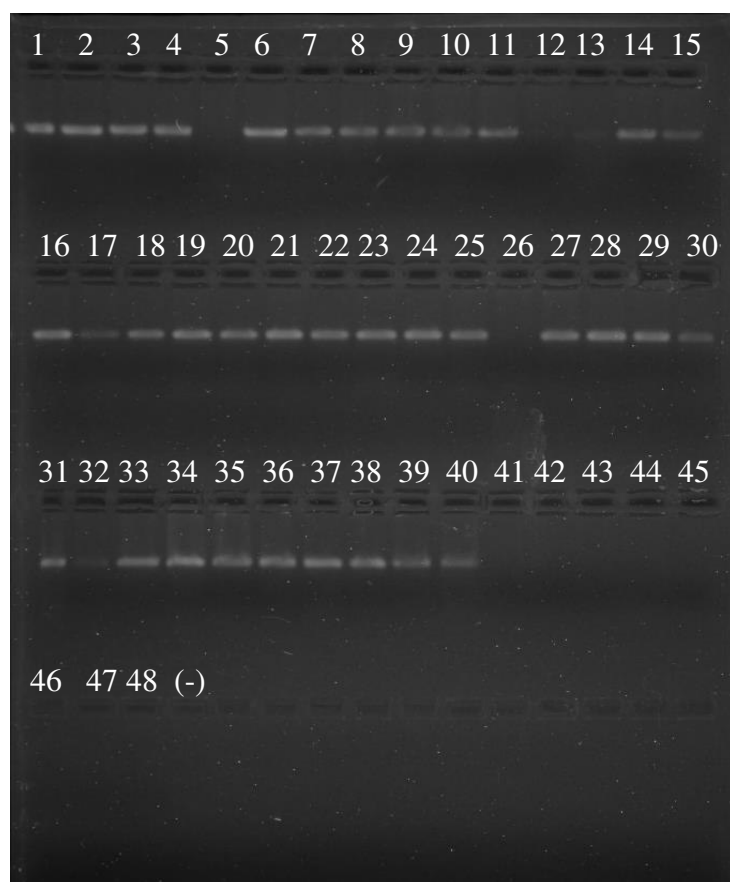


Figura 9. Amplificación del exón 4 de diferentes poblaciones. Muestras de ADN de 6 poblaciones corridas en un gel de agarosa al 2.5%. (1-8) Chíncha. (9-16) Tempestad. (17-24) Cajamarca. (25-32) Paíta. (33-40) Arequipa. (41-48)Chimbote. (-)Control Negativo.

Las muestras amplificadas para el reemplazo de las anteriores fueron en orden ascendiente: CHI 13, CHI19, TEM5, TEM7, TEM6, PAI 23, PAI 26, LIM 1, LIM 29, LIM 4, LIM 7, LIM 10, LIM 12, LIM 13, LIM 16, LIM 27, LIM 28, LIM 29, LIM 30, Control negativo. Se puede observar que todas amplificaron excepto la primera y la cuarta, sin embargo al menos una de cada población si amplificó por lo que no se tuvo que repetir, la población Lima amplificó en su totalidad, y reemplazó a las muestras de Chimbote, las primeras ocho fueron escogidas (Figura 10).

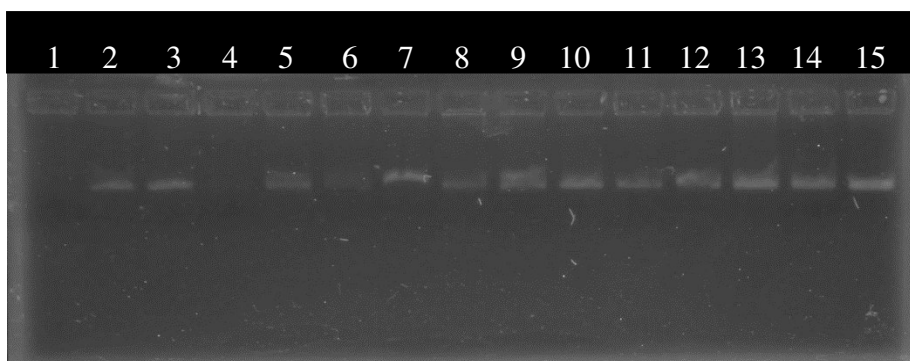


Figura 10. Amplificación de muestras adicionales de ADN. Muestras de ADN corridas en un gel de agarosa al 2.5%. (1)Control negativo, (2)CHI19, (3)TEM5, (4)TEM7, (5)TEM6, (6)PAI 23, (7)PAI 26, (8)LIM 1, (9)LIM 29. (10)LIM 4, (11)LIM 7, (12)LIM 10, (13)LIM 12, (14)LIM 13, (15)LIM 16.

5.3. OE-PCR

Las reacciones de OE-PCR se dieron correctamente en el segundo ensayo y en un solo paso, como se puede observar en la figura 11, las bandas obtenidas corresponden a los pesos correspondientes a los tres exones unidos de alrededor de 836 pb, también se pueden observar dos bandas correspondientes a la unión de los exones 2 y 3; y 3 y 4, de 521 y 597 pb respectivamente.

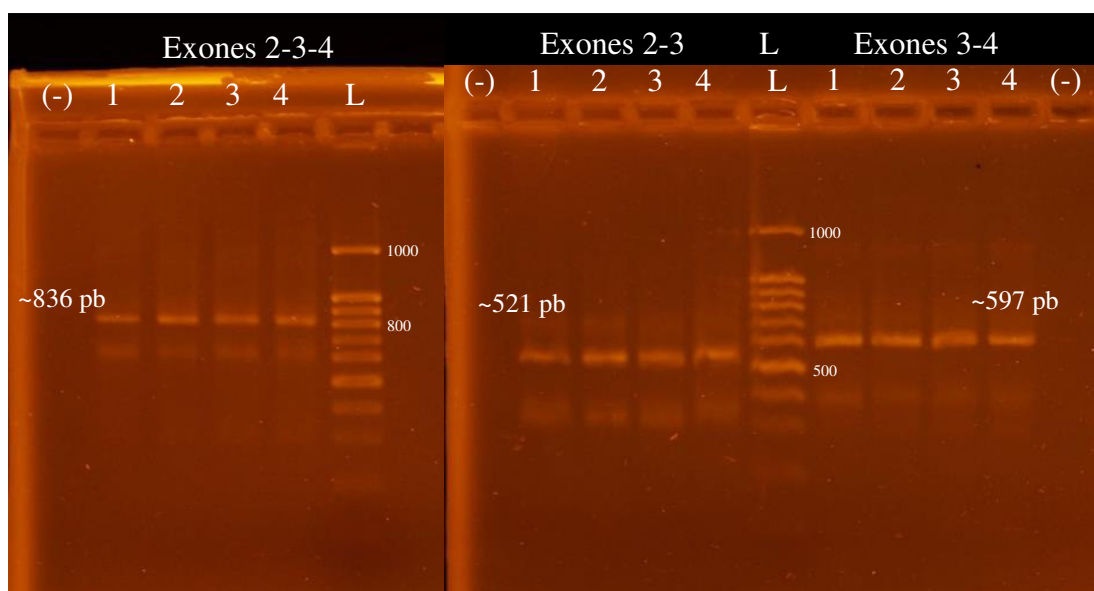


Figura 11. Resultados de la reacción de OE-PCR de 4 muestras. Se muestran los resultados de la amplificación de una sola reacción de los exones 2-3-4 (izquierda), 2-3 (centro) y 3-4 (derecha) corridos en un gel de agarosa al 2.5%. Las muestras fueron las siguientes: (1) CHI2. (2)PAI3. (3) TEM5. (4)CAJ4. (-)Control Negativo. (ld)Ladder 100 pb.

5.4. Secuenciamiento de ADN

Los electroferogramas obtenidos del secuenciamiento del exón 4 fueron alineados como se muestran en las figuras 12 y 13, se puede observar la mutación 808C>A (también conocida como 808G>T) en 3 individuos de los 48 secuenciados (2 de las muestras poblacionales mestizas y una de la nativa).

Exón 4

```

Exon_4      1 -----
Ref.      Exon_4  1 TTAAGGAAGGCAGACTTCTTAGCAGAATAAAATACTTTGATTATTTCTCTTTTATTCCA
1 RC OCT2 ARE_6  1 -----TCTTTTATTCCA
2 RC OCT2 ARE_7  1 -----TCTTTTATTCCA
3 RC OCT2 ARE_8  1 -----TCTTTTATTCCA
4 RC OCT2 ARE_13 1 -----TCTTTTATTCCA
consensus      1 .....

Exon 4      1 -----CAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAGCZACTGTGAACTGCA
Ref.      Exon_4  61 AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAGCZACTGTGAACTGCA
E1 RC OCT2 ARE_  14 AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAGCZACTGTGAACTGCA
E2 RC OCT2 ARE_  14 AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAGCZACTGTGAACTGCA
E3 RC OCT2 ARE_  14 AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAGCZACTGTGAACTGCA
E4 RC OCT2 ARE_  14 AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAGCZACTGTGAACTGCA
consensus      61 .....*****

Exon 4      50 ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCGTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCAACTGTAT
Ref.      Exon_4  121 ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCGTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCAACTGTAT
E1 RC OCT2 ARE_  74 ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCGTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCAACTGTAT
E2 RC OCT2 ARE_  74 ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCGTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCAACTGTAT
E3 RC OCT2 ARE_  74 ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCGTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCAACTGTAT
E4 RC OCT2 ARE_  74 ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCGTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCAACTGTAT
consensus      121 *****

Exon_4      110 AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCAACAAATTCTGTAA
Ref.      Exon_4  181 AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCAACAAATTCTGTAA
E1 RC OCT2 ARE_  134 AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCAACAAATTCTGTAA
E2 RC OCT2 ARE_  134 AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCAACAAATTCTGTAA
E3 RC OCT2 ARE_  134 AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCAACAAATTCTGTAA
E4 RC OCT2 ARE_  134 AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCAACAAATTCTGTAA
consensus      181 *****

Exon 4      170 -----
Ref.      Exon_4  241 CTGCAGAGAGAATTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTC
E1 RC OCT2 ARE_  194 CTGCAGAGAGAATTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTC
E2 RC OCT2 ARE_  194 CTGCAGAGAGAATTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTC
E3 RC OCT2 ARE_  194 CTGCAGAGAGAATTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTC
E4 RC OCT2 ARE_  194 CTGCAGAGAGAATTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTC
consensus      241 .....

```

Figura 12. Se presentan 4 de los 48 electroferogramas alineados con la secuencia de referencia, las cuales son idénticas. Se señala en rojo la mutación 808 A/C, la cual es compartida por todos los individuos.

OE-PCR

Los electroferogramas de las reacciones de secuenciación de las muestras amplificadas por OE-PCR salieron correctamente, se pueden observar los 3 exones en la longitud total de la secuencia (Figura 13), demostrando que la técnica funcionó adecuadamente, pudiendo obtener en una sola reacción los 3 exones unidos, evitando así enviar a secuenciar individualmente.

Ref.Amplicon234	1	TTAAGGAAGGCAGACTTCTTAGCAGAATAAAATACCTTTGATTATTTC	TCTTTTATTCCA
CHI2	1	-----	TCTTTTATTCCA
PAI3	1	-----	CTTTTATTCCA
TEM5	1	-----	TCTTTTATTCCA
CAJ4	1	-----	TCTTTTATTCCA
Exon4	1	-----	
Exon3	1	-----	
EXON2	1	-----	
Ref.Amplicon234	61	AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAG	AACTGTGAAGTGA
CHI2	14	AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAG	CACTGTGAAGTGA
PAI3	13	AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAG	CACTGTGAAGTGA
TEM5	14	AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAG	CACTGTGAAGTGA
CAJ4	14	AATGGACTTACCAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAG	CACTGTGAAGTGA
Exon4	1	-----CAGTAATAGAGCAAGAAGAAGAAGTTGGGCAGAG	CACTGTGAAGTGA
Exon3	1	-----	
EXON2	1	-----	
Ref.Amplicon234	121	ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCCTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCCA	ACTGTAT
CHI2	74	ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCCTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCCA	ACTGTAT
PAI3	73	ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCCTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCCA	ACTGTAT
TEM5	74	ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCCTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCCA	ACTGTAT
CAJ4	74	ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCCTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCCA	ACTGTAT
Exon4	50	ACCACCTCCAGTGAGGAAGTGCCTAAGCCACCCAGCTAGCACCAGGAGCCCCA	ACTGTAT
Exon3	1	-----	
EXON2	1	-----	
Ref.Amplicon234	181	AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCCA	CAAAATCTGTAA
CHI2	134	AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCCA	CAAAATCTGTAA
PAI3	133	AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCCA	CAAAATCTGTAA
TEM5	134	AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCCA	CAAAATCTGTAA
CAJ4	134	AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCCA	CAAAATCTGTAA
Exon4	110	AGGCAACTTGGTAAAAAATCCCCACTGTTCTCCGATATCTCCGCCCA	CAAAATCTGTAA
Exon3	1	-----	
EXON2	1	-----	
Ref.Amplicon234	241	CTGCAGAGAGAATTTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTCCAGC	
CHI2	194	CTGCAGAGAGAATTTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTCCAGC	
PAI3	193	CTGCAGAGAGAATTTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTCCAGC	
TEM5	194	CTGCAGAGAGAATTTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTCCAGC	
CAJ4	194	CTGCAGAGAGAATTTGAATGGTTAATGCAATTCAATACAATAATGAGTTGGCTGTCCAGC	
Exon4	170	-----	
Exon3	1	-----	
EXON2	1	-----	
Ref.Amplicon234	301	TATCAGTCTATTTTGGCAGCGAGGTTGCTTTGTTCTCACAGTTGCAAGCACAAACATTCT	
CHI2	254	TATCAGTCTATTTTGGCAGCGAGGTTGCTTTGTTCTCACAGTTGCAAGCACAAACATTCT	
PAI3	253	TATCAGTCTATTTTGGCAGCGAGGTTGCTTTGTTCTCACAGTTGCAAGCACAAACATTCT	
TEM5	254	TATCAGTCTATTTTGGCAGCGAGGTTGCTTTGTTCTCACAGTTGCAAGCACAAACATTCT	
CAJ4	254	TATCAGTCTATTTTGGCAGCGAGGTTGCTTTGTTCTCACAGTTGCAAGCACAAACATTCT	
Exon4	-----		
Exon3	1	-----	
EXON2	1	-----	

Ref.Amplicon234	361	TACTCAGGATGTAGCCTATTAACCAGCCTGCTTTGCTGACCAGTCCTTGGATTAAGCGAA
CHI2	314	TACTCAGGATGTAGCCTATTAACCAGCCTGCTTTGCTGACCAGTCCTTGGATTAAGCGAA
PAI3	313	TACTCAGGATGTAGCCTATTAACCAGCCTGCTTTGCTGACCAGTCCTTGGATTAAGCGAA
TEM5	314	TACTCAGGATGTAGCCTATTAACCAGCCTGCTTTGCTGACCAGTCCTTGGATTAAGCGAA
CAJ4	314	TACTCAGGATGTAGCCTATTAACCAGCCTGCTTTGCTGACCAGTCCTTGGATTAAGCGAA
Exon4		-----
Exon3	1	---TCAGGATGTAGCCTATTAACCAGCCTGCTTTGCTGACCAGTCCTTGGATTAAGCGAA
EXON2	1	-----
Ref.Amplicon234	421	AAATTAACATCCACGTATAGGTTGGGGAAATGGCCATGAGAACTCCAGCTGCAGCATTTA
CHI2	374	AAATTAACATCCACGTATAGGTTGGGGAAATGGCCATGAGAACTCCAGCTGCAGCATTTA
PAI3	373	AAATTAACATCCACGTATAGGTTGGGGAAATGGCCATGAGAACTCCAGCTGCAGCATTTA
TEM5	374	AAATTAACATCCACGTATAGGTTGGGGAAATGGCCATGAGAACTCCAGCTGCAGCATTTA
CAJ4	374	AAATTAACATCCACGTATAGGTTGGGGAAATGGCCATGAGAACTCCAGCTGCAGCATTTA
Exon4		-----
Exon3	58	AAATTAACATCCACGTATAGGTTGGGGAAATGGCCATGAGAACTCCAGCTGCAGCATTTA
EXON2	1	-----
Ref.Amplicon234	481	TGAGGACTGTAGTTAGGAGGCAGAGCTTACGGCCAAACCTGCAGGAAGAAAAACAAAGAG
CHI2	434	TGAGGACTGTAGTTAGGAGGCAGAGCTTACGGCCAAACCTGCAGGAAGAAAAACAAAGAG
PAI3	433	TGAGGACTGTAGTTAGGAGGCAGAGCTTACGGCCAAACCTGCAGGAAGAAAAACAAAGAG
TEM5	434	TGAGGACTGTAGTTAGGAGGCAGAGCTTACGGCCAAACCTGCAGGAAGAAAAACAAAGAG
CAJ4	434	TGAGGACTGTAGTTAGGAGGCAGAGCTTACGGCCAAACCTGCAGGAAGAAAAACAAAGAG
Exon4		-----
Exon3	118	TGAGGACTGTAGTTAGGAGGCAGAGCTTACGGCCAAAC-----
EXON2	1	-----
Ref.Amplicon234	541	AGGGAATTGAATTAATTTTGATTTGTGAAGATTGTGGAAAATGCATGGAATCCAAGTGTT
CHI2	494	AGGGAATTGAATTAATTTTGATTTGTGAAGATTGTGG AAAATGCATGGAATCCAAGTGTT
PAI3	493	AGGGAATTGAATTAATTTTGATTTGTGAAGATTGTGGAAAATGCATGGAATCCAAGTGTT
TEM5	494	AGGGAATTGAATTAATTTTGATTTGTGAAGATTGTGGAAAATGCATGGAATCCAAGTGTT
CAJ4	494	AGGGAATTGAATTAATTTTGATTTGTGAAGATTGTGGAAAATGCATGGAATCCAAGTGTT
Exon4		-----
Exon3		-----
EXON2	1	-----
Ref.Amplicon234	600	CTCCAAACCTTTGGGATTCTTTAAATTCCACCACAGGTGATTCAACCTACCTGTCTGCTA
CHI2	554	CTCCAAACCTTTGGGATTCTTTAAATTCCACCACAGGTGATTCAACCTACCTGTCTGCTA
PAI3	553	CTCCAAACCTTTGGGATTCTTTAAATTCCACCACAGGTGATTCAACCTACCTGTCTGCTA
TEM5	554	CTCCAAACCTTTGGGATTCTTTAAATTCCACCACAGGTGATTCAACCTACCTGTCTGCTA
CAJ4	554	CTCCAAACCTTTGGGATTCTTTAAATTCCACCACAGGTGATTCAACCTACCTGTCTGCTA
Exon4		-----
Exon3		-----
EXON2	1	-----CTGTCTGCTA
Ref.Amplicon234	660	TGTAGCCGATACTCATAGAGCCAATAAAGAATCCTACATTCAGTACTGATGACTGGAATAGGT
CHI2	614	TGTAGCCGATACTCATAGAGCCAATAAAGAATCCTACATTCAGTACTGATGACTGGAATAGGT
PAI3	613	TGTAGCCGATACTCATAGAGCCAATAAAGAATCCTACATTCAGTACTGATGACTGGAATAGGT
TEM5	614	TGTAGCCGATACTCATAGAGCCAATAAAGAATCCTACATTCAGTACTGATGACTGGAATAGGT
CAJ4	614	TGTAGCCGATACTCATAGAGCCAATAAAGAATCCTACATTCAGTACTGATGACTGGAATAGGT
Exon4		-----
Exon3		-----
EXON2	11	TGTAGCCGATACTCATAGAGCCAATAAAGAATCCTACATTCAGTACTGATGACTGGAATAGGT
Ref.Amplicon234	720	CCAACATCCAGGAGTTGGCACATACCAGGTTAAACTGCCAGCAGGGGAGAAGTGTTCCAA
CHI2	674	CCAACATCCAGGAGTTGGCACATACCAGGTTAAACTGCCAGCAGGGGAGAAGTGTTCCAA
PAI3	673	CCAACATCCAGGAGTTGGCACATACCAGGTTAAACTGCCAGCAGGGGAGAAGTGTTCCAA
TEM5	674	CCAACATCCAGGAGTTGGCACATACCAGGTTAAACTGCCAGCAGGGGAGAAGTGTTCCAA
CAJ4	674	CCAACATCCAGGAGTTGGCACATACCAGGTTAAACTGCCAGCAGGGGAGAAGTGTTCCAA
Exon4		-----
Exon3		-----
EXON2	71	CCAACATCCAGGAGTTGGCACATACCAGGTTAAACT-----

Figura 13. Alineamientos de las secuencias amplificadas por OE-PCR (exones 2, 3 y 4 unidos). Se presentan 4 electroferogramas alineados con la secuencia de referencia, la cual contiene la unión de los 3 amplicones, además todas son idénticas. Se señala en rojo la mutación 808 A/C, la cual es compartida por todos los individuos.

- Mutaciones y frecuencias genotípicas

Se puede observar la mutación 808C>A en el electroferograma de la figura 14 (parte superior), la cual muestra dos picos correspondiendo a un individuo heterocigoto para la mutación ubicada en el exón 4 del gen *SLC22A2*. Esta mutación conlleva el cambio de aminoácido Ser>Ala en la posición 270 de la proteína. El resto del exón 4 se encuentra altamente conservado, siendo la única mutación encontrada en la región. En las muestras amplificadas por OE-PCR tampoco se observan variaciones en el resto de exones.

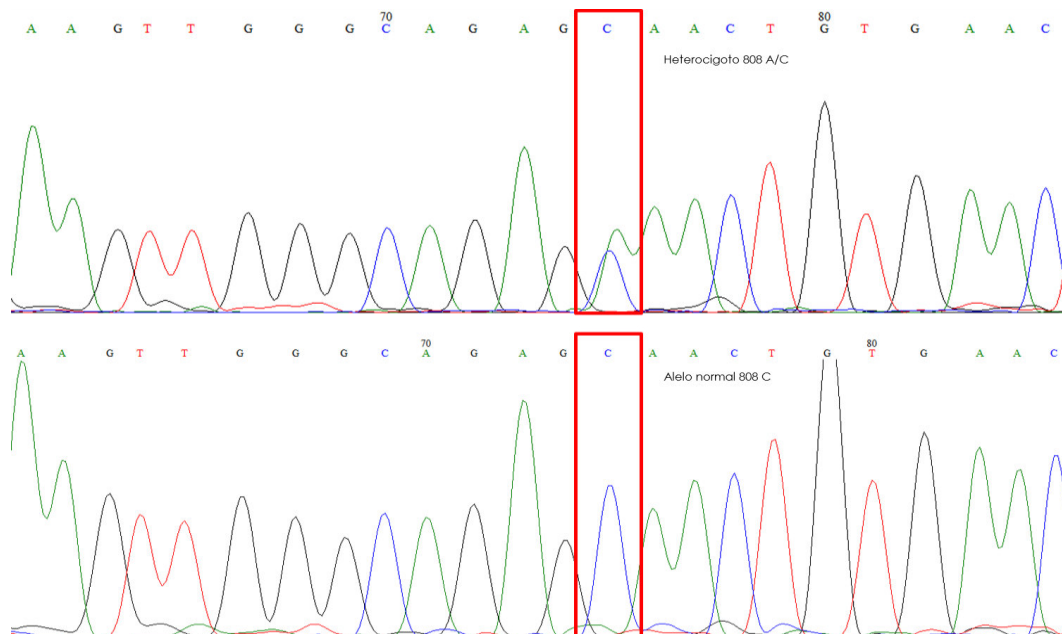


Figura 14. Electroferograma del exón 4 secuenciado. En la parte superior se observa la región correspondiente al polimorfismo 808C>A en un individuo heterocigoto, por lo que se puede observar dos picos correspondientes al alelo normal y mutado

La única mutación encontrada fue la 808C>A, la cual se encuentra en el 6.25% de la muestra analizada (3/48 individuos), en heterocigosis, y con una frecuencia alélica de 0.03 para el presente estudio. Al adicionar a la muestra analizada los datos obtenidos de la base de datos 1000 genomas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>) de 86 individuos de la población de Lima se puede observar una frecuencia alélica conjunta de 0.045 (Figura 15)

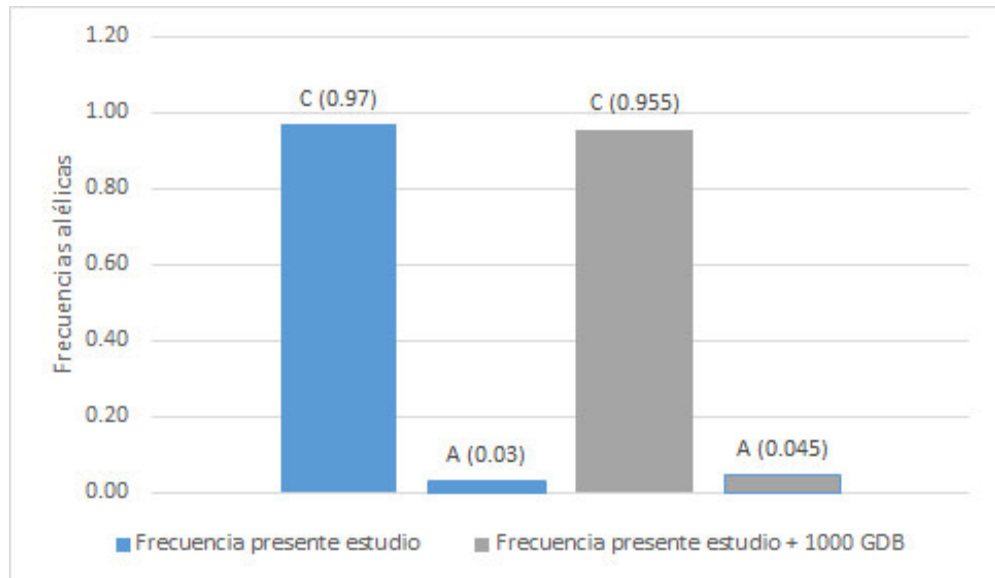


Figura 15. Frecuencias alélicas obtenidas en el presente estudio comparadas con las obtenidas adicionando la información de la base de datos 1000 genomas.

Asimismo se calculó la frecuencia genotípica de la mutación, la cual fue de 0.94 para homocigotos con alelo normal y de 0.06 para heterocigotos con la mutación 808C>A, de igual forma al adicionar a la muestra la información de la base de datos 1000 genomas se obtuvo una frecuencia genotípica similar, 0.91 para homocigotos del alelo normal y 0.09 para heterocigotos mutantes (Figura 16)

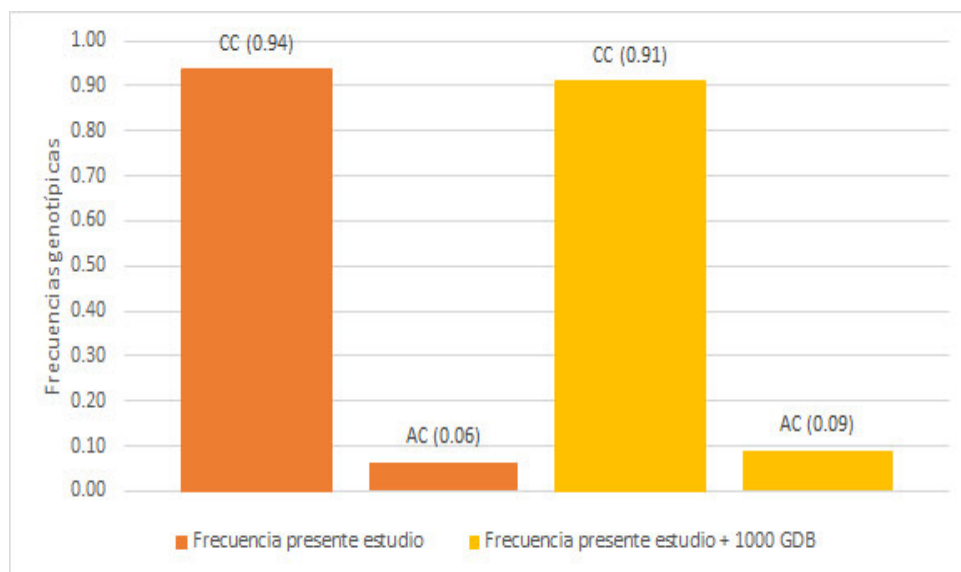


Figura 16. Frecuencias genotípicas obtenidas en el presente estudio comparadas con las obtenidas adicionando la información de la base de datos 1000 genomas.

5.5. Comparación de frecuencias alélicas entre muestra poblacional mestiza y nativa

Las frecuencias alélicas obtenidas en las poblaciones mestizas y nativa (0.025 y 0.0625, respectivamente) fueron comparadas haciendo uso del programa R. Para esto se armó una matriz con los datos de ambas poblaciones, se determinaron las proporciones y se realizó la prueba de chi-cuadrado, siendo nuestra hipótesis nula que ambas frecuencias son iguales, y la alternativa que son diferentes. El pvalue obtenido fue de 1, por lo que se acepta la hipótesis nula, concluyendo que no existe diferencia significativa entre ambas frecuencias (Figura 17).

```
> datos2<- matrix(c(1,2,15,78), nrow=2, dimnames= list(Grupo=c("Nativos", "Mestizos")
+ ,SNP=c("Si", "No")))
> datos2
      SNP
Grupo  Si No
Nativos  1 15
Mestizos  2 78
> prop.table(datos2,margin=1)
      SNP
Grupo  Si      No
Nativos 0.0625 0.9375
Mestizos 0.0250 0.9750
> prop.test(datos2)

      2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data:  datos2
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
 -0.1234435  0.1984435
sample estimates:
prop 1 prop 2
0.0625 0.0250
```

Figura 17. Prueba de chi-cuadrado de las frecuencias alélicas de las poblaciones mestizas y nativa, se observa que el pvalue es igual a 1, por lo que no existe diferencia significativa entre ambas poblaciones.

Finalmente se compararon las frecuencias alélicas de nuestra población con las reportadas en otras poblaciones, de igual forma se determinaron las proporciones y se realizó la prueba de chi-cuadrado para cada población con respecto a nuestro país observándose frecuencias similares para poblaciones latinas (México y Colombia) y con diferencia significativa para las demás poblaciones de Asia y África ($p<0.05$) (Tabla 3).

Frecuencias alélicas		
Poblaciones	C	A
Perú (Mestizos)	0.97	0.03
Perú (Nativos)	0.94	0.06
México	0.95	0.05
Colombia	0.92	0.08
China*	0.87	0.13
Japón**	0.83	0.17
Corea*	0.86	0.14
Bangladesh*	0.86	0.14
Dinamarca**	0.7	0.3
Bantú (África)**	0.8	0.2
Zulú (África)	0.91	0.09
Xhosa (África)**	0.85	0.15

Tabla 3. Comparación entre frecuencias alélicas del polimorfismo *SLC22A2* 808C>A de la muestra peruana analizada en el estudio y otras poblaciones (Takane H., et al., 2008; Li Q. et al., 2010; Jacobs C. et al., 2015; Wilson N, et al., 2017) Las diferencias significativas se muestra como: * $p<0.05$, ** $p<0.01$

6. DISCUSIÓN

La efectividad de la metformina es influenciada por la capacidad de los transportadores OCTs para permitir el ingreso o salida del fármaco hacia los tejidos diana y hacia su excreción (OCT1 y OCT2, respectivamente) (Jonker J & Schinkel A., 2003, Sogame Y. et al., 2013). Variaciones en la secuencia nucleotídica de los genes correspondientes *SLC22A1* y *SLC22A2* pueden afectar significativamente su actividad de transporte y, por tanto, la efectividad del fármaco. En la actualidad no existe información acerca de los polimorfismos del gen *SLC22A2* en nuestra población, la única referencia relacionada es sobre el gen *SLC22A1* en la cual se reporta el polimorfismo rs628031 que conlleva un cambio por sustitución aminoacídica Val/Met, la cual se reportó en nuestra población con una frecuencia de 12.4%, y se encuentra únicamente en heterocigocis (Olivares L., et al., 2017). Por tanto el análisis de la presente tesis se enfocó en el otro transportador, el OCT2, del cual no existen referencias nacionales.

En cuanto a la metodología usada para la extracción del ADN, descrita previamente por Aidar M. & Line S. (2007), se puede resaltar que el ADN obtenido se encuentra íntegro estructuralmente en la totalidad de las muestras, en los cuales se observa como una banda intensa en la parte superior, correspondiente al ADN genómico íntegro, además, se obtuvo concentraciones mayores a 50 ng/μl en todas las muestras con excepción de las de Chimbote, las cuales obtuvieron valores muy bajos (<14 ng/μl). Esto se debió a que primero se centrifugaron los tubos de colecta con los hisopos dentro, con la finalidad de obtener un pellet de células bucales en el fondo del tubo, descartando luego el hisopo. Esto no sucedió, al evidenciar los valores de concentraciones se concluye que la mayor parte de las células se quedó atrapado en el hisopo. Teniendo en cuenta este resultado es que para las siguientes muestras, la lisis se realizó en el mismo tubo conteniendo los hisopos, para que se lisen todas las células y el ADN sea liberado al medio para su posterior precipitación y purificación, obteniendo finalmente concentraciones de ADN mayores. La eficiencia del método usado es comparable a la obtenida haciendo uso de kits comerciales para extracción de ADN basados en columnas (Buccal Swab DNA Mini Kit, GenAid; Maxwell RSC Buccal Swab DNA Kit, Promega), obteniendo concentraciones y ratios similares, por lo que el protocolo usado es una

herramienta muy útil para poder obtener resultados con un bajo presupuesto, inclusive con muestras almacenadas por más de 1 mes antes de procesarlas.

La amplificación de los exones también fue óptima, los cebadores descritos por Kang H. et al (2007) amplificaron las regiones correspondientes, luego de una optimización de la concentración de cloruro de magnesio se escogió la concentración adecuada que de los amplicones más intensos (2.5 mM), la cual se usó en todo el estudio. La calidad de los amplicones obtenidos fue adecuada, por lo que las secuencias obtenidas no presentaron mucho ruido y pudieron ser analizadas rápidamente. Asimismo, la reacción de unión de los exones 2, 3 y 4, realizada mediante la técnica OE-PCR funcionó; los amplicones obtenidos se observaron en el gel de agarosa con el peso correspondiente al teórico según cada reacción de unión (exones 2 y 3, 3 y 4; y 2, 3 y 4), como se puede observar en la figura 9. El protocolo descrito por Thornton J. (2014) fue adaptado de forma eficiente a las condiciones del laboratorio, sin embargo se pueden observar algunas bandas adicionales poco intensas, las cuales corresponderían a amplificaciones de los cebadores sobrantes en las reacciones individuales iniciales, ya que no se realizó una purificación de amplicones por columnas o escisión de bandas de gel, lo cual sería lo ideal para la obtención de bandas únicas correspondientes a la unión de los exones. Los resultados obtenidos a partir de las reacciones de secuenciamiento fueron los esperados, se obtuvieron electroferogramas de buena calidad, por lo que la curación de secuencias no fue tan complicada.

Los resultados obtenidos del secuenciamiento muestran un alto grado de conservación de la región codificante estudiada en las 48 muestras secuenciadas del exón 4 y las 5 de los amplicones obtenidos por OE-PCR (exones 2 al 4), se encontró únicamente la mutación 808C>A en 3 individuos heterocigotos, 1 de la población nativa y 2 de la población mestiza, la cual se encuentra en el NCBI con el código rs316019 y conlleva a la sustitución aminoacídica Serina por Alanina en la posición 270 de la secuencia primaria de la proteína (Ser270Ala). Esta variante ya ha sido descrita con anterioridad (Fukushima-Uesaka H. et al., 2004; Kang H. et al., 2007; Choi M. & Song I., 2008; Jacobs C. et al., 2015) y es una de las más estudiadas en el gen *SLC22A2*. Esta variante se encuentra en la sexta región transmembrana de la proteína, y no conlleva a una alteración en cuanto a la localización celular proteica

ni a la expresión de ARN mensajero (Kang H. et al, 2007; Zolk O. et al., 2009). Se han realizado varios estudios clínicos acerca de la mutación 808C>A y su efecto sobre la disposición de la metformina en pacientes diabéticos (Song I. et al, 2008b; Wang Z. et al., 2008) señalando que pacientes homocigotos (808AA) presentan mayores concentraciones del fármaco a nivel plasmático, lo que es causado por el menor aclaramiento renal del mismo dado que el transporte del fármaco para su excreción es reducido, esto se debe a que esta variante conlleva a una sustitución aminoacídica en la posición 270, en la cual normalmente existe una serina (Ser270) la que se encuentra en una región del transportador importante para el reconocimiento de sustratos, al ésta ser sustituida por alanina, la significancia de la sustitución tiene como resultado el cambio de un aminoácido polar por uno no polar (Ser>Ala) lo cual alteraría la interacción receptor-sustrato (Zolk O. et al., 2009). Estudios farmacocinéticos en pacientes diabéticos ya han señalado que los pacientes heterocigotos 808AT para la sustitución aminoacídica Ser270Ala presentan niveles menores de aclaramiento renal de metformina (Tzvetkov M. et al., 2009), y niveles más altos de lactato plasmático, resaltando que esto puede causar el desarrollo de hiperlactacidemia, un efecto adverso de la terapia con metformina. Asimismo Li Q. et al. (2010) reportan una correlación entre esta mutación con la hiperlactademia, encontrando que pacientes homocigotos 808AA presentan una mayor concentración de lactato de sangre y una mayor incidencia de hiperlactademia comparado con pacientes con genotipo 808CC, además se encuentra una diferencia significativa en los niveles de lactato de pacientes mujeres comparado a los varones.

En poblaciones humanas los genotipos heterocigotos 408Val/Met y 270 Ser/Ala de los genes *SLC22A1* y *SLC22A2*, respectivamente, presentan frecuencias semejantes. Ambas variantes se asocian a un menor transporte de sustratos. El alelo 408Val es el más frecuente y se encuentra principalmente en estado de homocigosis para OCT1 mientras que para OCT2 el alelo 270Ser muestra la misma tendencia. El resultado del trabajo orienta hacia un comportamiento similar, lo cual puede sugerir que dada la alta homología y la cercanía entre ambos genes en el cromosoma 6, se encuentran bajo la misma presión selectiva (Hughes A., 1994).

La relevancia de esta variación para el transporte de metformina, también está relacionada con otros fármacos de importancia, como: atropina, cimetidina, ranitidina, ketamina e incluso antibióticos como levofloxacino y trimetoprim (Jung

et al., 2008; Koepsell H., et al., 2007; Fujita et al., 2006; Yonezawa et al., 2006) así como de otros fármacos por lo que es de gran importancia el estudio de esta y otras variantes de este y otros genes de relevancia farmacológica, ya que así como la variante Ser270Ala, existen otras variantes en otras regiones que pueden influenciar el efecto de la metformina, las cuales aún quedan por estudiar en la población peruana, complementando con otros genes relacionados de la misma vía metabólica de fármacos como la metformina, como el gen *SLC22A1*, *MATE2*, *MATE2-K*, etc.

No se observaron diferencias en cuanto a la cantidad de variantes en las secuencias analizadas entre la población nativa y mestizas, encontrándose únicamente la mutación 808C>A, en ambas poblaciones en el 6.25% de individuos analizados. Estudios en otras poblaciones reportan que esta variante es la más frecuente en el gen de estudio, y está presente en diferentes poblaciones con una frecuencia porcentual de hasta 15% (Sajib A. et al., 2018).

Algunos estudios exploratorios en otras poblaciones reportan frecuencias alélicas para el alelo C de 2, 9 y 14.9% en las regiones africanas de Bantú, Zulú y Xhosa, respectivamente, mientras que para la población africana en conjunto es de 13.7% (Wilson N. et al., 2017; Jacobs C. et al., 2015); en poblaciones asiáticas los resultados son similares, para China la frecuencia del alelo C es de 13.3% (Wang Z. et al., 2008), en Japon 16.8% (Fukushina-Uesaka H. et al., 2004) y en Korea 14% (Kang H. et al., 2007) por otro lado, las frecuencias alélicas reportadas en Bangladesh, estado del sur de Asia, se reporta un 14% para el alelo C (Islam T. et al., 2018). En cuanto a poblaciones europeas, las frecuencias reportadas para la población de Dinamarca es de un 30% para el alelo C (Christensen M. et al., 2013). En la actualidad no existen estudios previos hayan reportado la presencia y frecuencia de la mutación 808C>A en América, este estudio reportó para Perú una frecuencia de 0.03.

La presencia de esta variante en la muestra estudiada indica la necesidad de la exploración de otras regiones de este y otros genes en nuestra población, ya que además de los metabolitos internos que transporta OCT2, alrededor de un 40% de los fármacos prescritos para diferentes patologías se encuentran positivamente cargados por lo que este transportador en particular posee una gran importancia farmacológica (Islam T. et al, 2018) de tal forma que no solo se vería afectado la excreción de metformina, sino de otros fármacos no menos importantes, es así como

se plantea abordar de forma más amplia este campo que se denomina farmacogenética, para así poder alcanzar en un futuro cercano la implementación de una medicina personalizada, la cual ayudará a un tratamiento más efectivo y adecuado según el perfil genético de cada paciente.

7. CONCLUSIONES

Se pudo detectar en las poblaciones analizadas el polimorfismo rs316019 (808C>A) ubicado en el exón 4 del gen *SLC22A2*, con una frecuencia de 6.25%. Esta variante se encontró en 2 individuos de la población mestiza y uno de la población nativa.

Se estandarizó la técnica de OE-PCR para unión de exones individuales, lo que permitió analizar, en una sola reacción de secuenciamiento, varios loci de secuencia corta (exones 2, 3 y 4). Esta técnica permite un ahorro económico respecto al secuenciamiento de productos de PCR convencional.

No existe diferencia significativa en cuanto a las frecuencias alélicas entre la población nativa con relación a las poblaciones mestizas. Asimismo, comparando nuestra población con otras, se encontró que nuestra frecuencia alélica es similar a las poblaciones latinas de Colombia y México, y difiere significativamente de poblaciones más lejanas geográficamente en Asia y África.

8. RECOMENDACIONES

Así como esta variante, es necesario analizar otras regiones de este y otros genes de relevancia farmacológica en nuestra población para determinar la presencia de mutaciones con implicancia farmacológica de importancia clínica.

Para mejorar la reacción de OE-PCR se sugiere hacer una limpieza de los productos de PCR mediante escisión de bandas luego de la electroforesis o con kits de purificación de productos de PCR con columnas de sílice.

Es necesario hacer estudios similares en poblaciones de diferente origen étnico de nuestro país ya que los resultados pueden diferir entre éstas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidar M, Line S. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal*. 2007;18(2):148-152
- Amidon G, Sadée W. Membrane transporters as drug targets. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004
- Bailey C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 1989;12(8):553-64
- Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G., Foulfelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., and Baldwin, S.A.. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci* 2002; 115, 2433–2442
- Bourne R, Stevens G, White R, Smith J, Flaxman S, Price H et al. Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*. 2013;1(6):e339-e349
- Bryksin A, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques*. 2010;48(6):463-465
- Chen EC, Liang X, Yee SW, et al. Targeted disruption of organic cation transporter 3 attenuates the pharmacologic response to metformin. *Mol Pharmacol*. 2015;88(1):75-83
- Chen L, Shu Y, Liang X, Chen E, Yee S, Zur A, et al. OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;11(27):9983-88. doi: 10.1073/pnas.1314939111
- Choi M, Song I. Organic Cation Transporters and their Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Consequences. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2008; 23(4):243-253
- Christensen M, Pedersen R, Stage T, Brasch-Andersen C, Nielsen F, Damkier P et al. A gene–gene interaction between polymorphisms in the OCT2 and MATE1 genes influences the renal clearance of metformin. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2013;23(10):526-534
- Dresser MJ, Xiao G, Leabman MK, Gray AT, Giacomini KM: Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm Res*. 2002 Aug;19(8):1244-7. [PubMed:12240953]

- El-Mir M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Ave´ret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 223–228
- Frøsig C., Pehmøller, C., Birk, J.B., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F. Exercise-induced TBC1D1 Ser237 phosphorylation and 14-3-3 protein binding capacity in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2010; 588, 4539–4548
- Fujita T, Urban T, Leabman M, Fujita K, Giacomini K. Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2006; 95(1):25-36
- Fukushima-Uesaka H, Maekawa K, Ozawa S, Komamura K, Ueno K, Shibakawa M et al. Fourteen Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the *SLC22A2* Gene Encoding Human Organic Cation Transporter (OCT2). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2004; 19(3):239-244
- Gong L, Goswami S, Giacomini K, Altman R, Klein T. Metformin pathways: Pharmacogenetics and Genomics. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(11):820-827
- Gorboulev V, Ulzheimer J, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S et al. Cloning and Characterization of Two Human Polyspecific Organic Cation Transporters. *DNA and Cell Biology.* 1997;16(7):871-881
- Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011; 50:81–98. [PubMed: 21241070]
- Hawley, S.A., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Edelman, A.M., Carling, D., and Hardie, D.G. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 27186–27191
- Hou W, Zhang D, Lu W, Zheng T, Wan L, Li Q et al. Polymorphism of Organic Cation Transporter 2 Improves Glucose-Lowering Effect of Metformin via Influencing Its Pharmacokinetics in Chinese Type 2 Diabetic Patients. *Mol Diagn Ther.* 2015; 19(1):25-33
- Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research.* 1988;16(15):7351-7367.

- Hughes A. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1994;256:119–124
- Islam T, Rahman M, Paul N, Akhteruzzaman S, Sajib A. Allele-Specific Detection of SLC22A2 rs316019 Variants Associated with Metformin Disposition through the Kidney. *International Journal of Diabetes and Metabolism.* 2018;;22-28
- Ito S, Kusuvara H, Yokochi M, Toyoshima J, Inoue K, Yuasa H et al. Competitive Inhibition of the Luminal Efflux by Multidrug and Toxin Extrusions, but Not Basolateral Uptake by Organic Cation Transporter 2, Is the Likely Mechanism Underlying the Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions Caused by Cimetidine in the Kidney. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2011; 340(2):393-403
- Jacobs C, Pearce B, Du Plessis M, Hoosain N, Benjeddou M. Single nucleotide polymorphisms of the *SLC22A2* gene within the Xhosa population of South Africa. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2015;30(6):457-460
- Jonker J, Schinkel A. Pharmacological and Physiological Functions of the Polyspecific Organic Cation Transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2003;308(1):2-9
- Jung N, Lehmann C, Rubbert A, Knispel M, Hartmann P, van Lunzen J et al. Relevance of the Organic Cation Transporters 1 and 2 for Antiretroviral Drug Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Drug Metabolism and Disposition.* 2008;36(8):1616-1623
- Kang H, Song I, Shin H, Kim W, Lee C, Shim J et al. Identification and Functional Characterization of Genetic Variants of Human Organic Cation Transporters in a Korean Population. *Drug Metabolism and Disposition.* 2007; 35(4):667-675
- Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharmaceutical Research.* 2007;24(7):1227-1251
- Leabman M, Huang C, Kawamoto M, Johns S, Stryke D, Ferrin T et al. Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics.* 2002; 12(5):395-405

- Leabman MK, Giacomini KM. Estimating the contribution of genes and environment to variation in renal drug clearance. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 581–4
- Li Q, Liu F, Zheng T, Tang J, Lu H, Jia W. *SLC22A2* gene 808 G/T variant is related to plasma lactate concentration in Chinese type 2 diabetics treated with metformin. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(2):184-190
- Liang X, Chien H-C, Yee SW, et al. Metformin is a substrate and inhibitor of the human thiamine transporter, THTR-2 (SLC19A3). *Mol Pharm*. 2015;12(12): 4301-4310
- Muller J, Lips KS, Metzner L, Neubert RH, Koepsell H, Brandsch M. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol*. 2005; 70:1851–1860. [PubMed: 16263091]
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*. 2001; 332, 1433–1435
- Ogasawara K, Terada T, Motohashi H, Asaka J, Aoki M, Katsura T et al. Analysis of regulatory polymorphisms in organic ion transporter genes (*SLC22A*) in the kidney. *Journal of Human Genetics*. 2008; 53(7):607-614
- Olivares L, Villanueva M, Aparicio E, Yauri A, Medina R, De la Sota N et al. Polimorfismo Val/Met en gen OCT1 de respuesta a metformina en muestras de Lima y Puno. Enfoque farmacogenético de la diabetes. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2017; 78(2):11
- Saito S, Iida A, Sekine A, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S et al. Catalog of 238 variations among six human genes encoding solute carriers (hSLCs) in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2002; 47:576–584.
- Sajib A, Islam T, Paul N, Yeasmin S. Interaction of rs316019 variants of *SLC22A2* with metformin and other drugs- an in silico analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018;16(2):769-775
- Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, et al. Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010; 375:2215-22

- Seclen S, Rosas M, Arias A, Huayta E, Medina C. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in Peru: report from PERUDIAB, a national urban population-based longitudinal study. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2015;3(1):e000110
- Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K et al. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *Journal of Human Genetics*. 2006; 52(2):117-122
- Sogame Y, Kitamura A, Yabuki M, Komuro S, Takano M. Transport of biguanides by human organic cation transporter OCT2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2013;67(5):425-430.
- Song I, Shin H, Shim E, Jung I, Kim W, Shon J et al. Genetic Variants of the Organic Cation Transporter 2 Influence the Disposition of Metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008a; 84(5):559-562.
- Song I, Shin H, Shin J. Genetic variants of organic cation transporter 2 (OCT2) significantly reduce metformin uptake in oocytes. *Xenobiotica*. 2008b; 38(9):1252-1262
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., and Neumann, D. Dissecting the role of 50 -AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem*. 2006; 281, 32207–32216
- Takane H, Shikata E, Otsubo K, Higuchi S, Ieiri I. Polymorphism in human organic cation transporters and metformin action. *Pharmacogenomics*. 2008; 9(4):415-422
- Thornton J. Splicing by Overlap Extension PCR to Obtain Hybrid DNA Products. *Methods in Molecular Biology*. 2014;:43-49
- Tzvetkov M, Vormfelde S, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehr D et al. The Effects of Genetic Polymorphisms in the Organic Cation Transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the Renal Clearance of Metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 2009; 86(3):299-306
- Viollet B, Foretz M. Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Annales d'Endocrinologie*. 2013;74(2):123-129
- Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y: Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution

- of metformin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Aug;302(2):510-5. [PubMed:12130709]
- Wang Z, Yin O, Tomlinson B, Chow M. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2008; 18(7):637-645
 - Werner E; Bell J (1922). "The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyandiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively". *J. Chem. Soc., Trans.* 121:1790–5
 - WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications. Report of WHO Consultation. Geneva,WHO, 1999
 - WHO. World Health Organization Model List of Essential Medicines. Geneva, 2019
 - Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes care.* 2003; 27(5):1047-1053
 - Wilson N, Choudhury A, Carstens N, Mavri-Damelin D. Organic Cation Transporter 2 (OCT2/SLC22A2) Gene Variation in the South African Bantu-Speaking Population and Functional Promoter Variants. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.* 2017;21(3):169-176
 - Yang P, Nicolás J, Galván C, Vélez P, Da Ronco L, Díaz G et al. Efectividad de la metformina en pacientes con diabetes tipo II según variantes en el gen SLC22A1. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2014;48(2):229-235
 - Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and Oxaliplatin, but Not Carboplatin and Nedaplatin, Are Substrates for Human Organic Cation Transporters (SLC22A1-3 and Multidrug and Toxin Extrusion Family). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2006;319(2):879-886.
 - Yoon H, Cho H, Yoo H, Kim S, Lee Y. Influences of Organic Cation Transporter Polymorphisms on the Population Pharmacokinetics of Metformin in Healthy Subjects. *The AAPS Journal.* 2013; 15(2):571-580
 - Zhou M, Xia L, Wang J. Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35:1956–1962. [PubMed: 17600084]

- Zolk O, Solbach T, König J, Fromm M. Functional Characterization of the Human Organic Cation Transporter 2 Variant p.270Ala>Ser. Drug Metabolism and Disposition. 2009;37(6):1312-1318

10. ANEXOS

10.1. Consentimiento Informado

Lima, Perú, ____ de _____ del 201__

INFORMACION SOBRE EL CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES PARA EL PROYECTO
TITULADO: “CARACTERIZACION DE LA REGIÓN CODIFICANTE (EXONES 1,2 Y 3)
DEL GEN *SLC22A2* EN POBLACIONES COSTERAS DEL PERÚ”**

**LAB ECOLOGIA MOLECULAR Y BIODIVERSIDAD- FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS- UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS -2017**

Presentación

Soy un tesista del Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con dirección en: Calle Germán Amezcua 375 – Cercado de Lima, teléfono 6197000

- Investigador: Renzo CORTEZ PACHECO (Tesista).
- Asesor: Daniel Saúl ORE CHAVEZ (Jefe del Laboratorio)

El trabajo rutinario del laboratorio, está guiado por: La Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO, aprobada en 1997; La Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO, aprobada el 16 de Octubre del 2003; El Informe de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud sobre Control de las Enfermedades Genéticas, Documento EB116/3 del 21 de Abril de 2005 y la Comunicación 679 de la Comisión de las Comunidades Europeas sobre las Enfermedades Raras: un Reto para Europa del 11 de Noviembre del 2008. Igualmente, todos los integrantes del Servicio firmamos una Declaración de Confidencialidad, con respecto a los datos que manejamos durante nuestro trabajo.

Utilidad de este Consentimiento

El propósito de este documento es proporcionarle la información necesaria para que Ud., libremente, decida si desea donar una muestra de saliva para una posterior extracción del ADN. Por favor, lea la información que sigue y pregunte todo aquello que no entiende claramente. Una vez que esté seguro de haber comprendido cómo se toma la muestra de ADN y lo que se va a hacer con ella, Ud. debe decidir si desea tomarse la muestra.

¿Qué le estamos solicitando?

Que Ud. nos proporcione una muestra de saliva, de la cual obtendremos su ADN para ser empleado en procedimientos o análisis de genética molecular con fines de investigación científica. La muestra que nos proporcione la haremos confidencial, es decir, retiraremos la identificación correspondiente a su nombre y sólo registraremos el sexo y año de nacimiento.

¿En qué consiste la toma de muestra de saliva?

El ADN se encuentra en todas nuestras células, incluyendo las células del epitelio bucal, que tomaremos directamente de una muestra de saliva. Si Ud. estuviera de acuerdo, se le tomará una

muestra de saliva. La muestra a tomar es de uso exclusivo para estandarizar pruebas moleculares y para investigación. Recuerde **que** la muestra va a ser confidencial luego de ser tomada y no se podrá identificar la suya de entre las otras.

¿Se requiere información adicional?

Sí, se le preguntará por antecedentes personales, antecedentes familiares e información personal.

¿Podría haber molestias y/o riesgos para Ud.?

No presentara ninguna molestia ya que el procedimiento no es invasivo.

¿Cuáles son los beneficios?

Usted contribuirá al desarrollo y estandarización de técnicas de genética molecular que nos permitirán conocer algunas características moleculares de la población peruana que puede ser de utilidad para las investigaciones científicas en farmacogenética. No hay compensación económica por su participación en este estudio.

¿Es confidencial mi participación en este estudio?

Sí, su participación es confidencial, las muestras pasan a ser codificadas luego de ser colectada, no se entregan resultados ya que estas muestras no son para diagnóstico específico de enfermedad alguna. Sus datos personales (año de nacimiento y sexo) así como la muestra donada tendrán un código y no su nombre. Cuando los resultados de los trabajos se presentan para análisis estadístico u otros aspectos académicos de la Universidad, son manejados por personal institucional, conscientes de la confidencialidad. Si los resultados de estos estudios son publicados o presentados en ambientes científicos, su nombre no aparecerá.

En caso de preguntas adicionales ¿con quién podría contactar?

Ud. puede contactar:

Con el Investigador, Renzo Cortez Pacheco, Estudiante de Genética y Biotecnología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, al número 971 574 556

Una vez que esté seguro de haber entendido todo lo anterior y no tenga más preguntas, firme por favor la autorización o consentimiento informado para tomar la muestra de saliva, poder guardar su ADN y emplearlo en los procedimientos explicados. La firma del consentimiento informado deberá realizarse en presencia de un testigo. Ud. recibirá una copia de este documento y consentimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA DE ADN CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN EL PROYECTO TITULADO: “CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE (EXONES 1,2 Y 3) DEL GEN *SLC22A2* EN POBLACIONES COSTERAS DEL PERÚ”

LAB. ECOLOGIA MOLECULAR Y BIODIVERSIDAD - FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS- UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS -2017

Yo, _____, identificado con DNI No. _____ declaro que he sido informado(a) por el investigador Renzo Manuel Cortez Pacheco, estudiante de Genética y Biotecnología de la UNMSM, acerca de mi participación para desarrollar procedimientos moleculares para investigación en el laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias; estoy satisfecho (a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1.- Que se me extraiga una muestra de saliva para la implementación de procedimientos de Genética Molecular en el Laboratorio de Ecología Molecular y Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

Firma:

DNI:

Investigador que toma el Consentimiento

_____ DNI _____

Firma:

Lima, Perú, ____ de _____ del 201__

FICHA PERSONAL

Edad: _____

Sexo: Masculino Femenino

Ciudad de Origen: _____

10.2. Acta de aprobación del Comité de Ética del Instituto de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
"Año del Buen Servicio al Ciudadano"



ACTA N°. 0325

CÓDIGO DE PROYECTO: N°. 0424

ACTA DE EVALUACIÓN ÉTICA

En Lima, a los diecinueve días del mes de julio de 2017, se realizó la **revisión ética expeditiva**, a la Metodología y Éticas aplicadas en el proyecto: **"Caracterización de la región codificante (exones 1, 2 y 3) del Gen SLC22A2 (OCT2) en poblaciones costeras del Perú"** que el alumno Renzo Cortez Pacheco, ha cumplido satisfactoriamente,

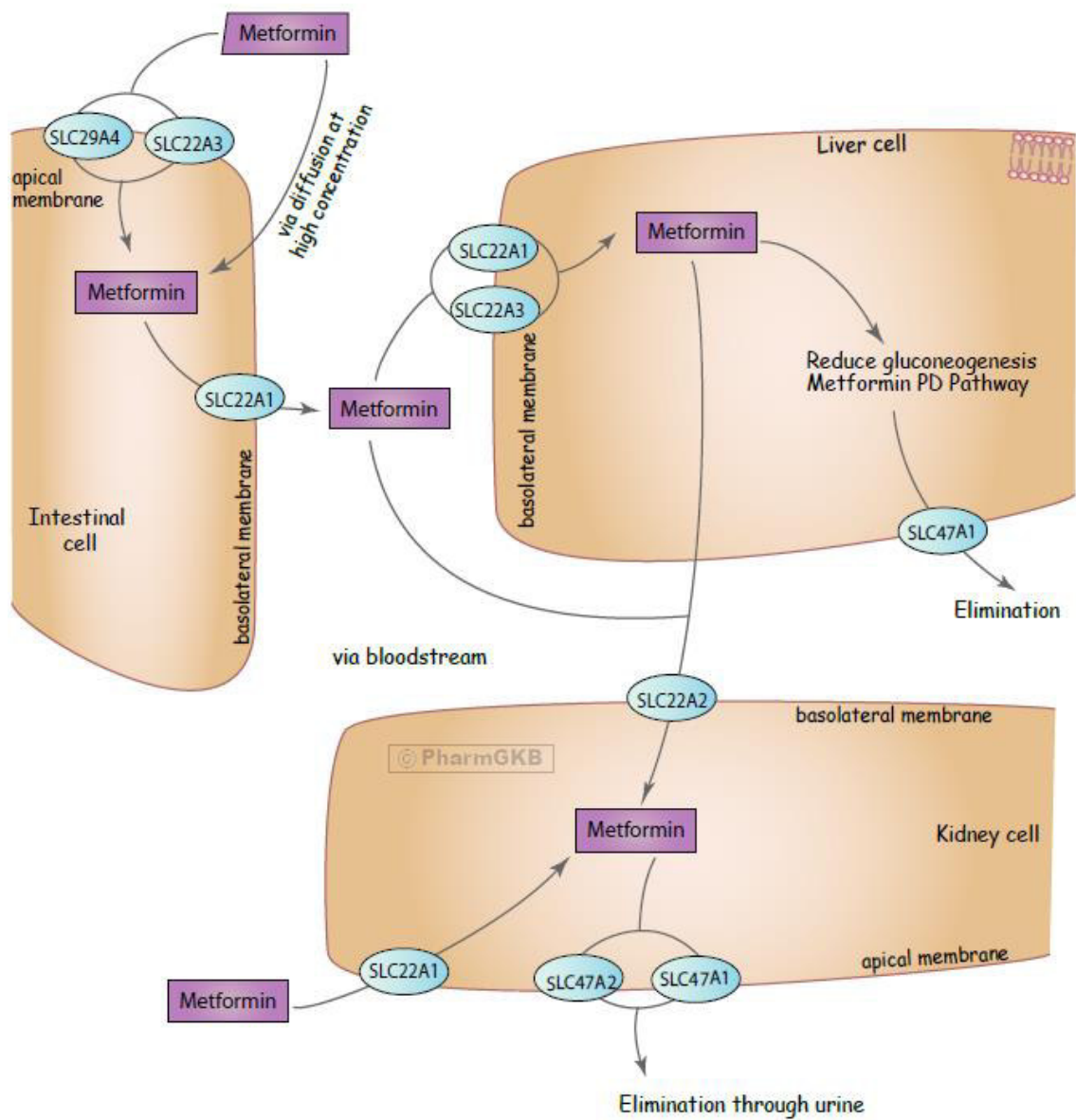
RESULTADO: PROYECTO APROBADO

Lima, 19 de julio de 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA

Dr. RICARDO TERUKINA TERUKINA
Presidente
del Comité de Ética de Investigación

10.3. Diagrama farmacocinético de la metformina



Representación esquemática del transporte de la metformina. © 2012 PharmGKB.

Gong Li, Goswami Srijib, Giacomini Kathleen M, Altman Russ B, Klein Teri E in Pharmacogenetics and genomics (2012). PubMed [22722338]. Con autorización de: PharmGKB y la Universidad de Stanford. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165948259>

10.4. Mecanismo de acción de la metformina

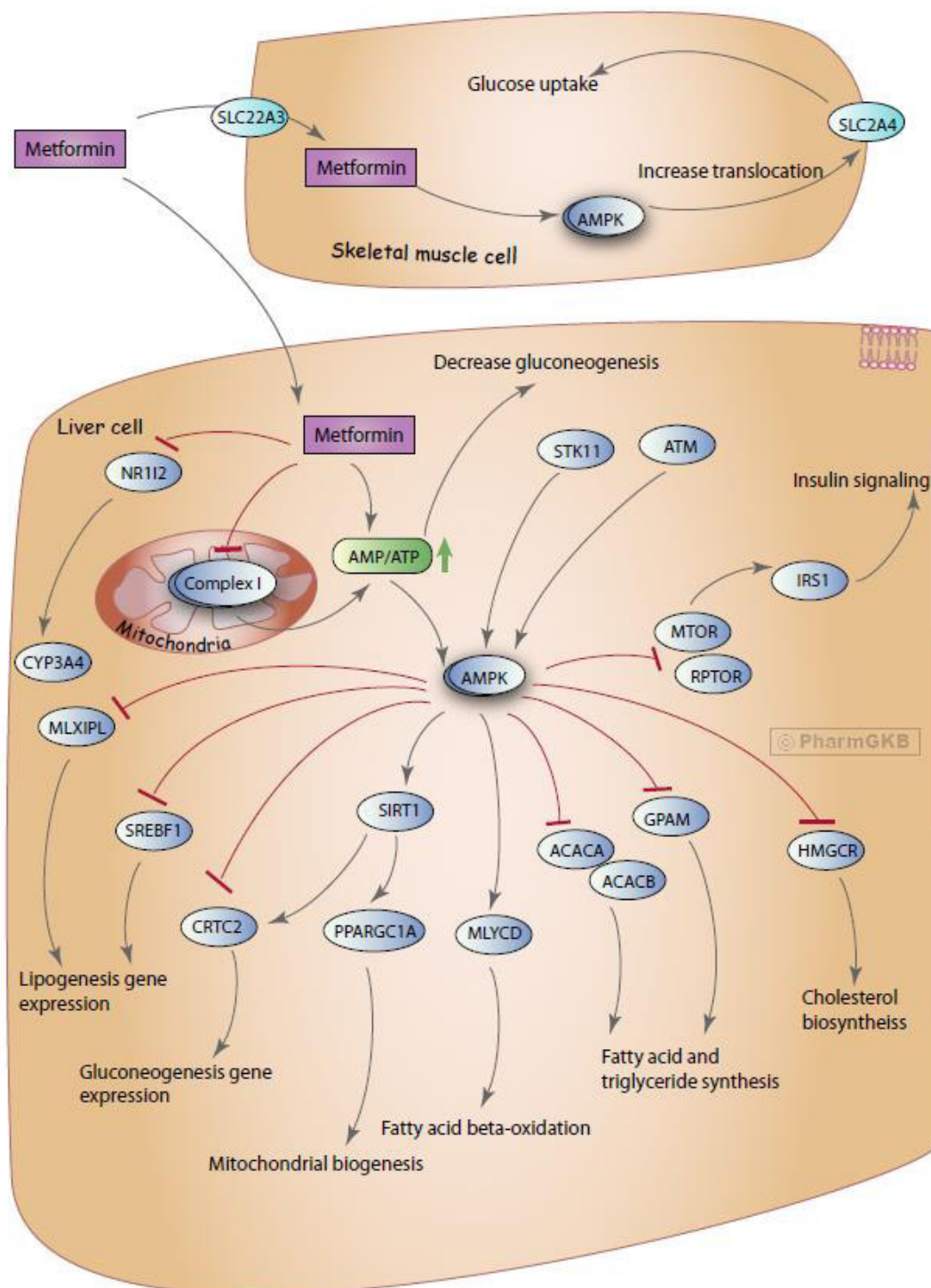


Diagrama simplificado del mecanismo de acción de la metformina. © 2012 PharmGKB.

(Gong Li, Goswami Srijib, Giacomini Kathleen M, Altman Russ B, Klein Teri E in Pharmacogenetics and genomics (2012). PubMed [22722338]. Con autorización de: PharmGKB y la Universidad de Stanford. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165948566/overview> <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>

10.5. Electroforesis de las muestras de ADN extraídas a partir de hisopado bucal de las diferentes poblaciones

Población de Chimbote (CHB 1-21)

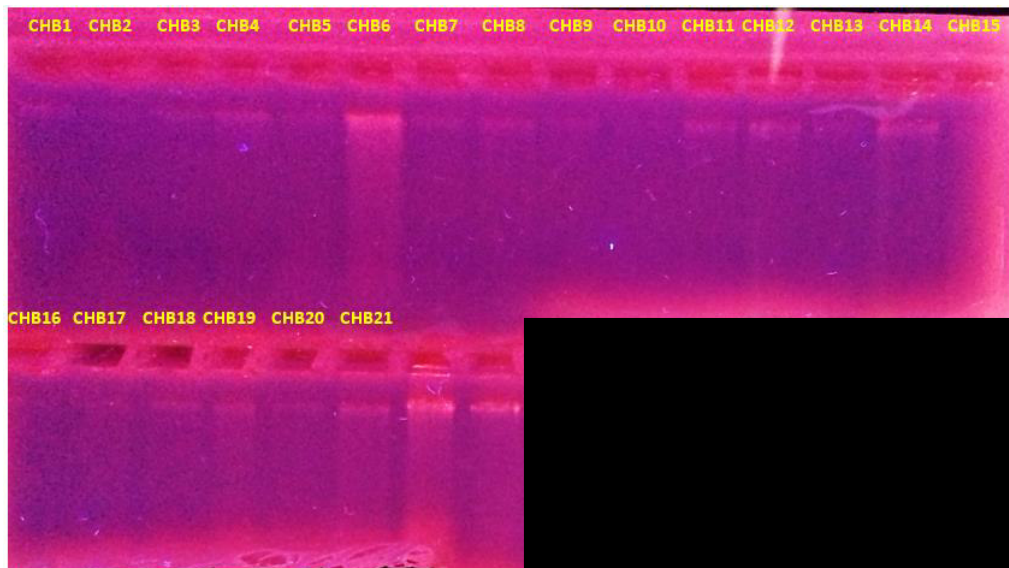


Fig 17. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de la población de Chimbote

Comunidad Nativa de Tempestad (TEM 1-15)

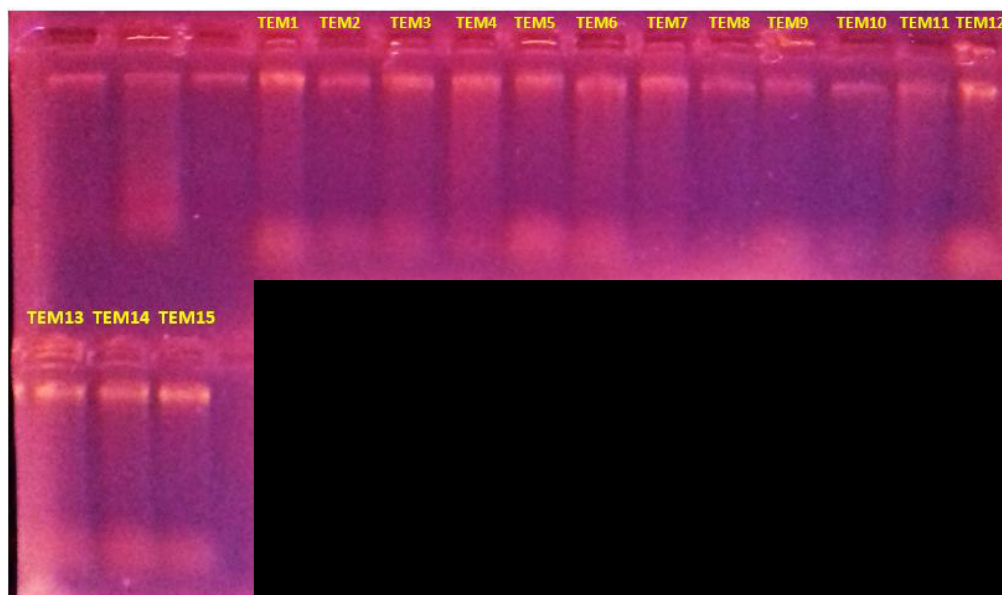


Fig 18. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de la población de Tempestad

Población de Chinchu (CHI 1-23)

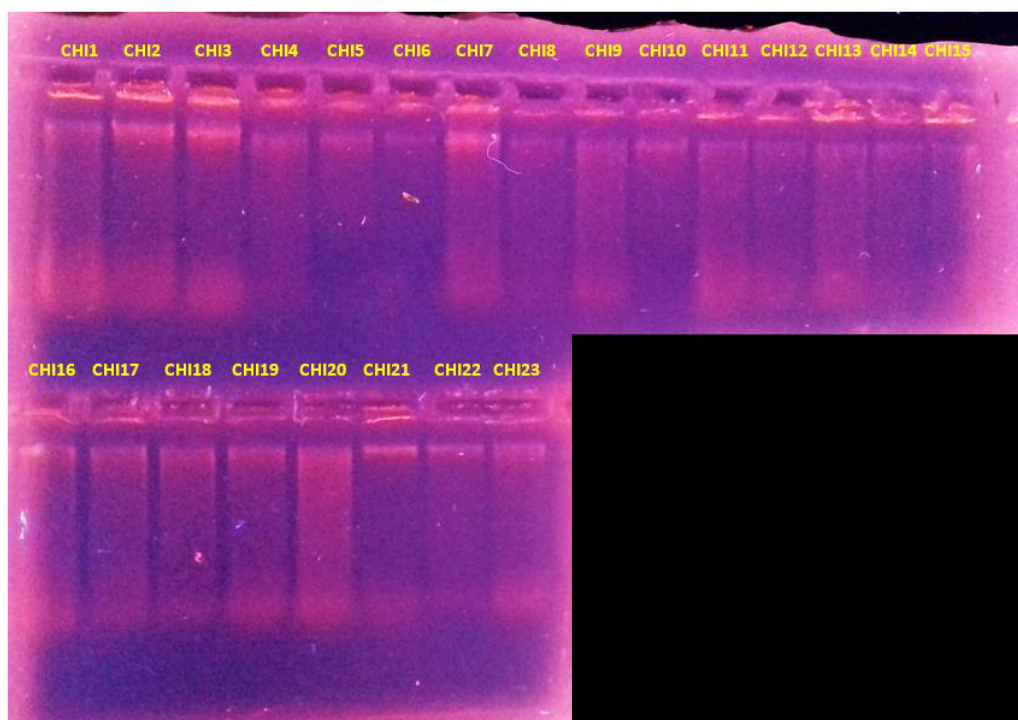


Fig 198. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de la población de Chinchu.

Población de Paita (PAI 1-31)

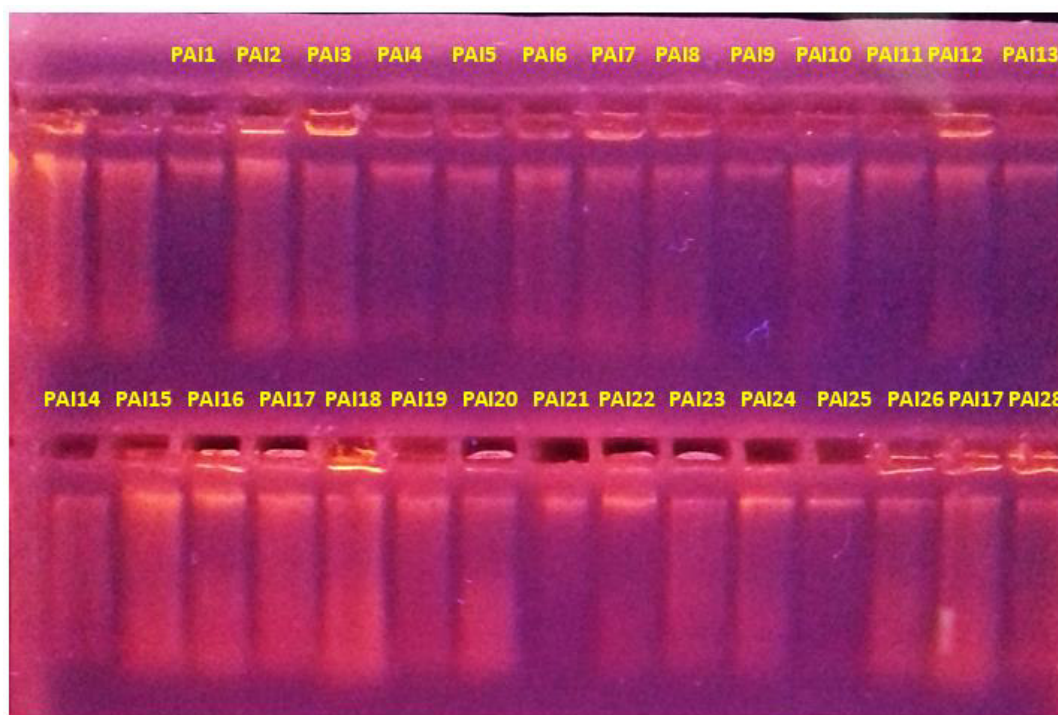


Fig 20. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de la población de Paita.

Población de Lima (LIM 1-30)

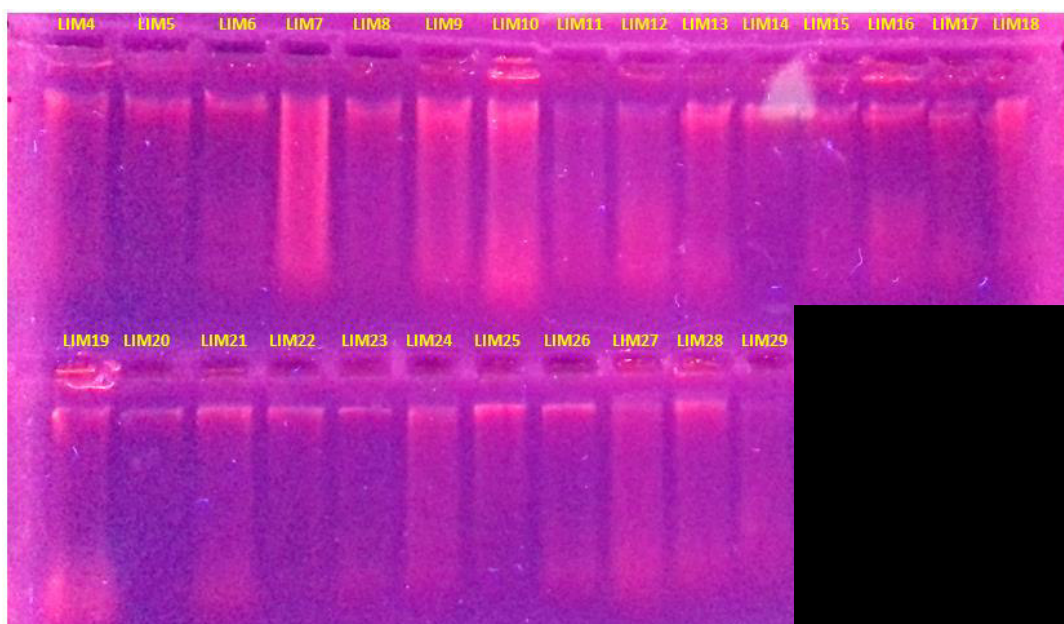


Fig 21. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de la población de Lima

Población de Arequipa (ARE 1-32)

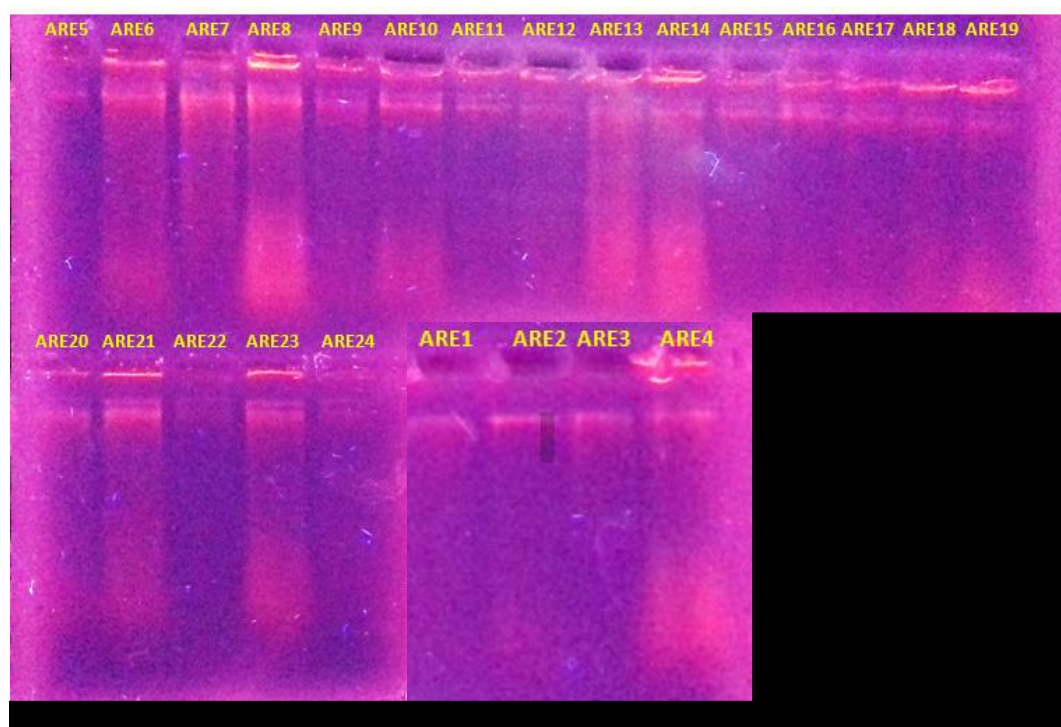


Fig 22. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de la población de Arequipa

10.6. Resultados de cuantificación de las muestras de ADN extraídas a partir de hisopado bucal en las diferentes poblaciones

Muestras Chíncha	Absorbancia 260/280	ng/ul
CHI 1	2.00	162.3
CHI 2	1.90	93.3
CHI 3	1.85	84.1
CHI 4	1.69	30.8
CHI 5	1.71	17.1
CHI 6	1.64	10.2
CHI 7	1.80	72.7
CHI 8	1.72	26.6
CHI 9	1.84	44.3
CHI 10	1.70	26.4
CHI 11	1.86	66.1
CHI 12	1.96	62.3
CHI 13	1.84	58.8
CHI 14	1.75	40.3
CHI 15	1.95	74.8
CHI 16	1.98	45.6
CHI 17	1.91	30.6
CHI 18	1.81	25.0
CHI 19	1.79	36.9
CHI 20	1.88	42.6
CHI 21	1.88	29.4
CHI 22	1.69	15.1
CHI 23	1.98	38.1

Muestras Chimbote	Absorbancia 260/280	ng/ul
CHB 1	1.45	7.2
CHB 2	1.59	11.4
CHB 3	1.25	6.8
CHB 4	1.24	8.8
CHB 5	1.48	14.1
CHB 6	1.61	34.8
CHB 7	1.33	9.1
CHB 8	1.28	10.1
CHB 9	1.26	6.9
CHB 10	1.19	5.0
CHB 11	1.49	8.5
CHB 12	1.20	10.6
CHB 13	1.23	6.3
CHB 14	1.54	20.2
CHB 15	1.70	13.6
CHB 16	1.14	5.0
CHB 17	1.13	9.3
CHB 18	1.30	12.2
CHB 19	1.53	14.0
CHB 20	1.11	6.2
CHB 21	1.32	13.8

Tablas 4 y 5. Cuantificación de las muestras de CHINCHA (izquierda) y CHIMBOTE (Derecha).

Muestras Tempestad	Absorbancia 260/280	ng/ul
TEM 1	1.78	79.7
TEM 2	1.72	28.3
TEM 3	1.60	52.9
TEM 4	1.61	45.7
TEM 5	1.76	95.5
TEM 6	1.75	61.5
TEM 7	1.73	48.1
TEM 8	1.70	34.6
TEM 9	1.90	104.1
TEM 10	1.65	31.8
TEM 11	1.76	53.1
TEM 12	1.87	122.4
TEM 13	1.79	66.0
TEM 14	1.82	85.6
TEM 15	1.73	66.9

Muestras Cajamarca	Absorbancia 260/280	ng/ul
CAJ 1	1.82	40.1
CAJ 2	1.81	52.1
CAJ 3	1.60	11.6
CAJ 4	1.79	20.7
CAJ 5	1.72	37.0
CAJ 6	1.75	39.9
CAJ 7	1.79	47.8
CAJ 8	1.73	39.9
CAJ 9	2.00	113.0
CAJ 10	1.54	14.9
CAJ 11	1.84	79.6
CAJ 12	1.86	115.8
CAJ 13	1.88	78.5
CAJ 14	1.86	61.3
CAJ 15	1.77	30.7
CAJ 16	1.93	161.4
CAJ 17	1.85	69.6
CAJ 18	1.69	25.4
CAJ 19	1.89	72.0
CAJ 20	1.75	30.4

Tablas 6 y 7. Cuantificación de las muestras de TEMPESTAD (LORETO) (Izquierda) y CAJAMARCA (Derecha).

Muestras Paíta	Absorbancia 260/280	ng/ul
PAI 1	1.79	22.5
PAI 2	1.83	80.9
PAI 3	1.88	45.3
PAI 4	1.81	21.8
PAI 5	1.52	30.7
PAI 6	1.78	31.9
PAI 7	1.76	33.3
PAI 8	1.83	28.5
PAI 9	1.56	10.6
PAI 10	1.77	33.1
PAI 11	1.63	21.2
PAI 12	1.79	51.4
PAI 13	1.77	21.7
PAI 14	1.71	36.9
PAI 15	1.94	92.8
PAI 16	1.92	92.5
PAI 17	1.90	84.0
PAI 18	1.98	177.6
PAI 19	1.82	46.9
PAI 20	1.98	76.2
PAI 21	1.68	21.8
PAI 22	1.95	34.9
PAI 23	1.95	50.0
PAI 24	1.96	41.6
PAI 25	1.92	19.5
PAI 26	1.91	64.5
PAI 27	2.00	126.2
PAI 28	1.91	51.9
PAI 29	1.89	18.8
PAI 30	1.82	44.1
PAI 31	1.77	13.5

Muestras Arequipa	Absorbancia a 260/280	ng/ul
ARE 1	1.79	14.5
ARE 2	1.73	15.0
ARE 3	1.79	19.0
ARE 4	1.85	160.5
ARE 5	1.56	11.36
ARE 6	1.85	106.7
ARE 7	1.85	53.8
ARE 8	1.95	180.2
ARE 9	1.86	31.9
ARE 10	1.86	68.9
ARE 11	1.73	19.1
ARE 12	1.74	30.4
ARE 13	1.91	94.6
ARE 14	1.87	114.9
ARE 15	1.74	27.1
ARE 16	1.69	41.9
ARE 17	1.78	27.2
ARE 18	1.72	67.8
ARE 19	1.89	84.0
ARE 20	1.73	29.7
ARE 21	1.80	49.3
ARE 22	1.64	13.3
ARE 23	1.73	71.3
ARE 24	1.59	17.4
ARE 25	1.59	114.7
ARE 26	1.81	42.9
ARE 27	1.92	57.9
ARE 28	1.75	107.4
ARE 29	1.73	28.1
ARE 30	1.80	39.9
ARE 31	1.66	12.4
ARE 32	1.75	30.1

Tablas 8 y 9. Cuantificación de las muestras de PAITA (Izquierda) y AREQUIPA (Derecha).

Muestra	Absorbancia 260/280	ng/ul
LIM 1	1.92	120.5
LIM 2	1.96	96.7
LIM 3	1.77	37.6
LIM 4	1.87	61.5
LIM 5	1.86	30.5
LIM 6	1.90	33.7
LIM 7	1.86	84.8
LIM 8	1.82	30.5
LIM 9	1.94	64.7
LIM 10	1.93	127.7
LIM 11	1.80	33.0
LIM 12	1.96	55.7
LIM 13	1.92	51.2
LIM 14	1.72	15.0
LIM 15	1.88	38.2
LIM 16	1.97	67.3
LIM 17	1.93	40.4
LIM 18	1.80	38.3
LIM 19	1.87	177.2
LIM 20	1.68	11.3
LIM 21	1.91	41.7
LIM 22	1.70	13.2
LIM 23	1.69	15.8
LIM 24	1.72	25.9
LIM 25	1.81	21.6
LIM 26	1.93	30.0
LIM 27	1.88	65.2
LIM 28	1.85	60.9
LIM 29	1.85	40.6

Tabla 10. Cuantificación de las muestras de LIMA.

FE DE ERRATAS

1. **En la sección Agradecimientos, de la pagina II, dice:** “Este proyecto fue financiado parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”,

debe decir: “Este proyecto fue financiado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”

2. **En la sección Conclusiones, de la página 46, dice:** “Se pudo detectar en las poblaciones analizadas el polimorfismo rs316019 (808C>A) ubicado en el exón 4 del gen *SLC22A2*, con una frecuencia de 6.25%. Esta variante se encontró en 2 individuos de la población mestiza y uno de la población nativa”,

debe decir: Se pudo detectar en la muestra poblacional analizada el polimorfismo rs316019 (808C>A) ubicado en el exón 4 del gen *SLC22A2*, con una frecuencia de 6.25%. Esta variante se encontró en dos individuos mestizos y uno nativo”

3. **En la sección Conclusiones, de la página 46, dice:** “No existe diferencia significativa en cuanto a las frecuencias alélicas entre la población nativa con relación a las poblaciones mestizas. Asimismo, comparando nuestra población con otras, se encontró que nuestra frecuencia alélica es similar a las poblaciones latinas de Colombia y México, y difiere significativamente de poblaciones más lejanas geográficamente en Asia y África”,

debe decir: No existe diferencia significativa en cuanto a las frecuencias alélicas entre la población nativa con relación a las poblaciones mestizas. Asimismo, comparando las frecuencias alélicas peruanas con las de Colombia y México, estas no son significativamente diferentes, pero difieren significativamente de poblaciones mas alejadas de Asia y África”

4. **En la sección Discusión, de la página 45, dice:** Algunos estudios exploratorios en otras poblaciones reportan frecuencias alélicas para el alelo C de 2, 9 y 14.9% en las regiones africanas de Bantú, Zulú y Xhosa, respectivamente, mientras que para la población africana en conjunto es de 13.7% (Wilson N. et al., 2017; Jacobs C. et al., 2015); en poblaciones asiáticas los resultados son similares,

para China la frecuencia del alelo C es de 13.3% (Wang Z. et al., 2008), en Japon 16.8% (Fukushina-Uesaka H. et al., 2004) y en Korea 14% (Kang H. et al., 2007) por otro lado, las frecuencias alélicas reportadas en Bangladesh, estado del sur de Asia, se reporta un 14% para el alelo C (Islam T. et al., 2018). En cuanto a poblaciones europeas, las frecuencias reportadas para la población de Dinamarca es de un 30% para el alelo C (Christensen M. et al., 2013). En la actualidad no existen estudios previos hayan reportado la presencia y frecuencia de la mutación 808C>A en América, este estudio reportó para Perú una frecuencia de 0.03”,

debe decir: “Algunos estudios exploratorios en otras poblaciones reportan frecuencias alélicas para el alelo A de 2, 9 y 14.9% en las regiones africanas de Bantú, Zulú y Xhosa, respectivamente, mientras que para la población africana en conjunto es de 13.7% (Wilson N. et al., 2017; Jacobs C. et al., 2015); en poblaciones asiáticas los resultados son similares, para China la frecuencia del alelo A es de 13.3% (Wang Z. et al., 2008), en Japón 16.8% (Fukushina-Uesaka H. et al., 2004) y en Korea 14% (Kang H. et al., 2007) por otro lado, las frecuencias alélicas reportadas en Bangladesh, estado del sur de Asia, se reporta un 14% para el alelo A (Islam T. et al., 2018). En cuanto a poblaciones europeas, las frecuencias reportadas para la población de Dinamarca es de un 30% para el alelo A (Christensen M. et al., 2013). En la actualidad no existen estudios previos hayan reportado la presencia y frecuencia de la mutación 808C>A en América, este estudio reportó para Perú una frecuencia de 0.03”